



**Bárbara da Silva  
Oliveira**

**Eficiência de uma lipase na transesterificação de  
óleo alimentar usado**





## **Eficiência de uma lipase na transesterificação de óleo alimentar usado**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Isabel da Silva Nunes, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.



## **o júri**

Presidente

Professor Doutor Luís António da Cruz Tarelho

Professor Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

vogal

Professora Doutora Nídia Sá Caetano

Professora Coordenadora do Instituto Superior de Engenharia do Porto

vogal

Professora Doutora Maria Isabel da Silva Nunes

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Nunes, por me ter aceite sob sua orientação, um grande agradecimento, pela disponibilidade que sempre manifestou, pelo seu inestimável apoio e incentivo, e pelas suas valiosas sugestões científicas de cariz teórico e prático. Um sincero agradecimento por todos os ensinamentos que me transmitiu.

À Mestre Maria Jorge Pratas pela constante disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e ajuda nas análises de cromatografia gasosa.

Ao César Oliveira pelo apoio prestado na instalação e operação do evaporador rotativo a vácuo.

A todos os docentes que tive ao longo dos anos que passei no Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro pelo papel fundamental que tiveram na minha formação tanto através dos conhecimentos transmitidos, como pelos seus exemplos de seriedade, profissionalismo e empenho.

Aos meus pais por me terem dado esta oportunidade e à minha irmã. Obrigada a todos por estarem sempre presentes, por acreditarem que sou capaz, pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu namorado, por estar presente nos momentos mais difíceis, pelo seu apoio e incentivo constante e sobretudo por me fazer acreditar que tudo é possível.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu profundo agradecimento.





## palavras-chave

Óleo Alimentar Usado (OAU), biodiesel, catálise enzimática, Novozyme<sup>®</sup> 435, pré-tratamento, regeneração

## resumo

Os óleos alimentares usados (OAU) constituem um fluxo de resíduos de difícil gestão, e uma parte significativa destes, sobretudo provenientes do sector doméstico, ainda não possui um destino adequado. Actualmente, a produção de biodiesel é uma das operações de valorização mais promissora deste resíduo, face à procura de fontes de energia alternativas aos combustíveis de origem fóssil. O crescente interesse sobre a utilização dos biocombustíveis como substitutos dos carburantes derivados do petróleo deve-se às alterações climáticas, ao aumento do preço do petróleo e à segurança do abastecimento energético. O biodiesel é produzido através da reacção de transesterificação entre um óleo vegetal e um álcool, na presença de um catalisador. Todo o desenvolvimento do processo está estritamente relacionado com o tipo de catalisador e depende fortemente deste.

O principal objectivo do presente trabalho consistiu em estudar a perda de actividade de um catalisador enzimático, - a enzima Novozyme<sup>®</sup> 435 - ao longo dos diversos ciclos sucessivos de utilização. Para tal, a reacção de transesterificação foi levada a cabo sob dois métodos distintos: uso de solvente (tert-butanol) e adição de metanol por estágios. A enzima virgem foi pré-tratada e as condições operatórias em ambos os métodos foram:  $T = 40^{\circ}\text{C}$ , razão mássica catalisador:OAU=10%, razão molar metanol:OAU=4:1, razão volumétrica de solvente: OAU 0,75 v/v (no método de adição de solvente) e agitação orbital de 200 rpm.

No método de uso de solvente o maior rendimento em ésteres conseguido foi de 96%, e de 75% quando o metanol foi adicionado por estágios; ambos conseguidos no primeiro ciclo de utilização da enzima.

Em qualquer um dos métodos observou-se uma perda de actividade da enzima, de ciclo para ciclo, sendo mais acentuada no método em que foi usado solvente.

A lavagem/regeneração da enzima foi testada em ambos os métodos. Verificou-se que este procedimento não favoreceu a actividade enzimática, em qualquer dos métodos. Por outras palavras, o teor em ésteres não aumentou relativamente ao valor obtido no ciclo anterior, tendo mesmo diminuindo.

A título de curiosidade, foram analisadas algumas propriedades do biodiesel produzido e verificou-se que, praticamente todos os limites impostos pela norma EN ISO 14214:2003 não eram cumpridos.

Os objectivos da presente dissertação foram alcançados. Na literatura consultada existem poucos estudos sobre a produção de biodiesel, via catálise enzimática, principalmente quando a matéria-prima é o OAU. Com o presente trabalho pretendeu-se dar uma contribuição na imensa área dos biocombustíveis, sendo também uma alternativa de valorização viável a um resíduo de difícil gestão.



## keywords

Waste Cooking Oil (WCO), biodiesel, enzymatic catalysis, Novozyme<sup>®</sup> 435, pre-treatment, regeneration

## abstract

The waste cooking oils (WCO) are a difficult management waste stream, therefore a significant part of them do not have an appropriate destination. Currently, the production of biodiesel is one of the most promising recovery operations of this waste, in order to be an alternative energy source to fossil fuels. The increasing interest to use biofuels as substitutes for petroleum fuels are: the climate changes, increasing oil prices and security of energy supply.. Typically, biodiesel is produced through the transesterification reaction between an vegetable oil and an alcohol in the presence of a catalyst. The whole process development is closely related to the type of catalyst and strongly depends on him.

The main objective of this work was to investigate the activity loss of the enzyme Novozyme<sup>®</sup> 435 throughout the several using cycles. For this, the transesterification reaction was carried out by two distinct methods: the use of solvent (tert-butanol) and addition of methanol through stages. The virgin enzyme was pre-treated and the operating conditions were:  $T = 40^{\circ}\text{C}$ , mass ratio catalyst:WCO=10%, molar ratio methanol:OAU=4:1, volume ratio of solvent 0.75 v/v (solvent method) and orbital agitation 200 rpm.

The highest yield achieved esters content was 96% in the using solvent method and 75% when methanol was added in stages, both attained in the first cycle of the enzyme use.

In either method there was a loss of enzyme activity from cycle to cycle, which was more evident in the solvent method.

The enzyme regeneration was tested in both methods. It was found that this procedure did not improve the enzyme activity in any of the methods. In other words, the esters contents did not increased in comparison to those value obtained in the previous cycle. More, they decreased.

Out of curiosity, it was analyzed some properties of produced biodiesel and it was observed that almost all limits imposed by EN ISO 14214:2003 were not fulfilled.

The aims of this thesis have been achieved. In literature there are few studies on biodiesel production via enzymatic catalysis, especially when the raw material is the WCO. The current work was intended to give a contribution in the area of biofuels, which is also a viable alternative for recover a difficult management waste



## Índice

<b>Índice .....</b>	<b>i</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>ix</b>
<b>Nomenclatura .....</b>	<b>xi</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Relevância e motivação .....	1
1.2 Objectivos e estrutura da dissertação .....	5
<b>2 Estado da arte da produção de biodiesel .....</b>	<b>7</b>
2.1 Introdução .....	7
2.2 Reacções de transesterificação e esterificação .....	9
2.3 Variáveis determinantes no processo de produção .....	10
2.3.1 Óleo vegetal (usado) .....	10
2.3.2 Álcool .....	12
2.3.3 Catalisador .....	15
2.3.3.1 Catálise homogénea .....	18
2.3.3.2 Catálise heterogénea .....	19
2.3.3.3 Catálise enzimática .....	21
2.3.4 Temperatura .....	29
2.3.5 Agitação .....	30
2.3.6 Tempo de reacção .....	31
2.3.7 Teor de água .....	32
2.4 Enzimas .....	33
2.4.1 Estrutura das proteínas e das enzimas .....	36
2.4.2 Actividade catalítica das enzimas e factores que a afectam .....	37
2.4.2.1 pH .....	38
2.4.2.2 Temperatura .....	39
2.4.2.3 Concentração do substrato .....	41
2.4.2.4 Presença de água .....	41
2.4.2.5 Glicerol .....	42
2.4.3 Armazenamento .....	42
2.4.4 Pré-tratamento e regeneração da enzima .....	43

---

2.5	Conclusão .....	46
<b>3</b>	<b>Procedimentos e planeamento experimentais.....</b>	<b>49</b>
3.1	Introdução .....	49
3.2	Ensaio a realizar .....	50
3.3	Material e métodos .....	53
3.3.1	Caracterização do OAU e do biodiesel .....	54
3.3.1.1	Densidade .....	54
3.3.1.2	Viscosidade .....	55
3.3.1.3	Teor de humidade.....	57
3.3.1.4	Valor de iodo.....	58
3.3.1.5	Valor ácido.....	59
3.3.1.6	Massa molar .....	60
3.3.1.7	Teor em ésteres.....	62
3.3.2	Pré-tratamento do OAU .....	64
3.3.3	Reacção de transesterificação.....	65
3.4	Conclusão .....	68
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>69</b>
4.1	Introdução .....	69
4.2	Caracterização do OAU.....	70
4.2.1	Viscosidade .....	70
4.2.2	Densidade .....	70
4.2.3	Teor de humidade .....	71
4.2.4	Valor ácido .....	71
4.2.5	Massa molar .....	72
4.3	Reacção de transesterificação .....	74
4.3.1	Método: uso de solvente.....	76
4.3.2	Método: adição de metanol por estágios .....	81
4.3.3	Adição de metanol por estágios <i>versus</i> uso de solvente.....	85
4.4	Caracterização do biodiesel .....	88
4.4.1	Teor em ésteres .....	89
4.4.2	Viscosidade .....	90
4.4.3	Densidade .....	92
4.4.4	Valor ácido .....	93
4.4.5	Valor de iodo .....	95
4.5	Conclusões .....	97

---

---

<b>5</b>	<b>Considerações finais .....</b>	<b>101</b>
5.1	Introdução .....	101
5.2	Conclusões gerais.....	101
5.3	Sugestões para trabalhos futuros.....	104
	<b>Referências .....</b>	<b>107</b>
	<b>Anexo A – Dados de segurança de reagentes e catalisador .....</b>	<b>115</b>
	<b>Anexo B – Destino dos resíduos produzidos neste estudo.....</b>	<b>121</b>
	<b>Anexo C – Grelha de resultados .....</b>	<b>123</b>





---

## Índice de Figuras

Figura 2.1	Reacção de transesterificação relativa à produção de biodiesel.....	9
Figura 2.2	Reacção de esterificação por catálise ácida (Leung et al., 2009). ....	10
Figura 2.3	Efeito da razão molar metanol:óleo no rendimento da reacção de transesterificação do óleo de girassol usado com metanol, catalisada pela Lipozyme RM IM (Sonare and Rathod, 2010). ....	13
Figura 2.4	Influência do tipo de álcool na conversão dos triglicerídeos. Representado a preto está o metanol, a branco o etanol, a cinzento claro o propanol e a cinzento escuro o butanol (Rodrigues et al., 2008).....	14
Figura 2.5	Reacção de saponificação do catalisador (hidróxido de sódio) e do ácido gordo livre formando sabão e água (Leung et al., 2009). ....	18
Figura 2.6	Reacção de hidrólise (Leung et al., 2009). ....	19
Figura 2.7	Mecanismo do catalisador heterogéneo alcalino, CaO, na transesterificação de triglicerídeos (Lam et al., 2010).....	20
Figura 2.8	Mecanismo de produção de ésteres metílicos por catálise enzimática (Al-Zuhair et al., 2007).....	23
Figura 2.9	Micro reacção sem e com solvente, onde está patente o efeito do metanol na água, na presença/ausência de solvente (Fu and Vasudevan, 2009). ....	26
Figura 2.10	Efeito da quantidade de tert-butanol na actividade da enzima Novozyme <sup>®</sup> 435 (Talukder et al., 2009). ....	27
Figura 2.11	Efeito da razão mássica de Novozyme <sup>®</sup> 435 na reacção de transesterificação. Círculos, razão molar etanol:óleo de 1:1 e quadrados, razão molar etanol:óleo de 4,5:1 (Hernandez-Martin and Otero, 2008). ....	29
Figura 2.12	Efeito da temperatura na metanólise. Os triângulos brancos representam o tempo reaccional de 60 h os outros referem-se ao tempo reaccional de 30 h (Nie et al., 2006). ....	30
Figura 2.13	Efeito da intensidade de agitação na reacção de transesterificação de óleo de palma alimentar usado com metanol (Halim and Kamaruddin, 2008).....	31

---

Figura 2.14 Evolução a concentração de triglicerídeos (quadrados), ésteres metílicos (triângulos) e linoleato de metilo (círculos) do óleo de semente de algodão ao longo do tempo, num sistema descontínuo (Royon et al., 2007).....	32
Figura 2.15 Efeito da concentração de água na mistura reaccional no rendimento dos produtos da transesterificação enzimática (ésteres alquílicos) e hidrólise (ácidos) (Antczak et al., 2009).....	33
Figura 2.16 Fórmula geral do aminoácido (Mathewson, 1998).....	36
Figura 2.17 Influência do pH na actividade de uma enzima comercial típica (Mathewson, 1998).....	38
Figura 2.18 Perda da estrutura tridimensional de uma proteína como resultado da desnaturação (Mathewson, 1998).....	39
Figura 2.19 Influência da temperatura na actividade de uma enzima comercial típica (Mathewson, 1998).....	40
Figura 2.20 Influência da temperatura na actividade enzimática e na taxa de reacção (Enzymes in industry : production and applications, 2004).....	40
Figura 2.21 Efeito da concentração do substrato na actividade enzimática (Mathewson, 1998).....	41
Figura 2.22 Efeito do pré-tratamento das lipases (Novozyme <sup>®</sup> 435 e IM 60) no teor em FAME, durante a metanólise de óleo de farelo de arroz refinado (Lai et al., 2005).....	45
Figura 3.1 Fotografias da montagem experimental usada na determinação da viscosidade.....	57
Figura 3.2 Procedimento adoptado na sililação e preparação das amostras para análise por CG.....	64
Figura 3.3 Esquema do procedimento experimental num sistema de adição de metanol por estágios.....	66
Figura 3.4 Esquema do procedimento experimental num sistema com uso de solvente.....	67
Figura 4.1 Fotografia do esquema experimental usado na reacção de transesterificação do OAU.....	75
Figura 4.2 Evolução do rendimento de ésteres dos ciclos realizados com uso de solvente T= 40°C, 200 rpm, razão molar metanol:OAU=4:1, razão volumétrica t-butanol 0,75 v/v, razão mássica de catalisador=10% .....	78

---

---

Figura 4.3	Rendimento em ésteres no estado de equilíbrio, nos ensaios com uso de solvente.....	80
Figura 4.4	Efeito da regeneração no rendimento em ésteres no Ciclo 3 T= 40°C, 200 rpm, razão molar metanol:OAU=4:1, razão volumétrica t-butanol 0,75 v/v, razão mássica de catalisador=10%.....	81
Figura 4.5	Ilustração do aspecto da enzima antes a) e após a sua lavagem b).....	82
Figura 4.6	Evolução do rendimento em ésteres dos ciclos realizados com adição de metanol por estágios. T= 40°C, 200 rpm, razão molar metanol:OAU=4:1 em quatro estágios, razão mássica de catalisador=10 ....	83
Figura 4.7	Rendimento em ésteres no estado de equilíbrio, nos ensaios com adição de metanol por estágios.....	85
Figura 4.8	Comparação do rendimento máximo de ésteres no método do uso de solvente e no método de adição de metanol por estágios ao longo dos ciclos T= 40°C, 200 rpm, razão molar metanol:OAU=4:1, razão volumétrica t-butanol 0,75 v/v, razão mássica de catalisador=10%.....	86
Figura 4.9	Comparação da velocidade inicial da reacção no método de uso de solvente e no método de adição de metanol por estágios ao longo dos ciclos de utilização consecutiva da enzima.....	87
Figura 4.10	Viscosidade das amostras de biodiesel, a) metanol por estágios, b) solvente e c) ambos os métodos. ....	91
Figura 4.11	Densidade das amostras de biodiesel. ....	93
Figura 4.12	Valor ácido das amostras de biodiesel. ....	94
Figura 4.13	Valor de iodo das amostras de biodiesel, a) metanol por estágios, b) solvente e c) ambos os métodos. ....	96



## Índice de Tabelas

Tabela 2.1	Principais vantagens e desvantagens da utilização de metanol e etanol na reacção de transesterificação. ....	15
Tabela 2.2	Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores usados na produção de biodiesel (Leung et al., 2009). ....	17
Tabela 2.3	Coeficientes de partição dos solventes mais utilizados na reacção de transesterificação (Antczak et al., 2009). ....	26
Tabela 2.4	Lipases microbianas utilizadas em estudos sobre a produção de biodiesel em sistemas contendo solvente orgânico ou não (Antczak et al., 2009). ....	35
Tabela 2.5	Comparação de algumas variáveis em diferentes métodos de produção de biodiesel por transesterificação (Adaptado de Helwani et al., 2009 e Al-Zuhair, 2007). ....	47
Tabela 3.1	Resumo das condições experimentais na transesterificação por catálise enzimática praticadas por outros autores .....	50
Tabela 3.2	Condições operatórias usadas nos ensaios com uso de solvente e adição de metanol por estágios. ....	51
Tabela 3.3	Factores $f_i$ de alguns ésteres metílicos (EN ISO 14214:2003, Anexo B). ....	59
Tabela 4.1	Viscosidade cinemática do OAU (T=40°C). ....	70
Tabela 4.2	Densidade do OAU. ....	70
Tabela 4.3	Teor de humidade do OAU. ....	71
Tabela 4.4	Valor ácido do OAU. ....	72
Tabela 4.5	Dados necessários à determinação da massa molar do OAU. ....	73
Tabela 4.6	Composição típica em ácidos gordos (% m/m) do óleo de amendoim refinado. ....	74
Tabela 4.7	Resumo dos valores do $\eta_{\text{ésteres}}$ e do DIC nos ensaios com uso de solvente. ....	79
Tabela 4.8	Resumo dos valores do $\eta_{\text{ésteres}}$ e do DIC nos ensaios com adição de metanol por estágios. ....	84
Tabela 4.9	Concentrações iniciais dos reagentes da reacção. ....	88

---

Tabela 4.10 Teor de ésteres das amostras finais analisadas por cromatografia gasosa.....	89
Tabela 4.11 Volume de titulante gasto por mililitro de amostra na determinação do valor ácido.....	95
Tabela A.1 Dados de segurança da acetona (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto). ....	115
Tabela A.2 Dados de segurança do álcool isopropílico (José M. Vaz Pereira, ficha de dados de segurança do produto). ....	116
Tabela A.3 Dados de segurança da clorotrimetilsilano (Merck, ficha de dados de segurança do produto). ....	117
Tabela A.4 Dados de segurança do éter de petróleo (Merck, ficha de dados de segurança do produto). ....	117
Tabela A.5 Dados de segurança do metanol (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto). ....	118
Tabela A.6 Dados de segurança do metil heptadecanoato (Fluka, ficha de dados de segurança do produto). ....	118
Tabela A.7 Dados de segurança da N,O-Bis (trimetilsilil)Trifluoracetamida (Panreac, ficha de dados de segurança do produto). ....	119
Tabela A.8 Dados de segurança da piridina (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto). ....	119
Tabela A.9 Dados de segurança do tert-butanol (Sigma-Aldrich, ficha de dados de segurança do produto). ....	120
Tabela A.10 Dados de segurança da Novozyme® 435 (Novozymes France S.A., ficha de dados de segurança do produto).....	120
Tabela B.1 Resíduos gerados neste estudo e respectivo destino.....	121
Tabela C.1 Resultados pormenorizados nos diversos ensaios realizados. ....	123

---

---

## Nomenclatura

$A$	Área do(s) pico(s) do cromatograma	[-]
$C$	Concentração	[mg/mL]
$c$	Constante do viscosímetro	[mm <sup>2</sup> /s]
$f_i$	Factor para cálculo do valor de iodo	[-]
$M$	Massa molar	[g/mol]
$m$	Massa	[kg]
$n$	Número de moles	[n]
$T$	Temperatura	[°C]
$t$	Tempo	[s]
$V$	Volume	[L]
$w$	Fracção mássica	[kg/kg]
$W$	Humidade	[-]

### Abreviaturas e siglas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
bs	Base seca
CBO	Carência bioquímica de oxigénio
CQO	Carência química de oxigénio
CG	Cromatografia gasosa
CG	Cromatografia gasosa
DIC	Declive inicial da curva
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
FAEE	<i>Fatty acid ethyl ester</i> (Ésteres etílicos de ácidos gordos)
FAME	<i>Fatty acid methyl esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos gordos)
HORECA	Hotéis, restaurantes e cantinas
LER	Lista europeia de resíduos
OAU	Óleo alimentar usado
rpm	Rotações por minuto
SST	Sólidos suspensos totais
UE	União Europeia

### Letras gregas

$\rho$	Massa volúmica	[g/L]
$\overline{\rho}$	Massa volúmica média	[g/L]
$\Delta$	Intervalo	[-]
$\nu$	Viscosidade cinemática	[mm <sup>2</sup> /s]
$\eta$	Rendimento	[%]



---

**Índices**

$x$	Número de átomos de carbono na fórmula empírica geral da mistura de ésteres
$xx$	Número de átomos de carbono na fórmula empírica geral da mistura de triglicerídeos
$y$	Número de átomos de hidrogénio na fórmula empírica geral da mistura de ésteres
$yy$	Número de átomos de hidrogénio na fórmula empírica geral da mistura de triglicerídeos
$z$	Número de átomos de oxigénio na fórmula empírica geral da mistura de ésteres
$zz$	Número de átomos de oxigénio na fórmula empírica geral da mistura de triglicerídeos

**Nomenclatura química**

KOH	Hidróxido de potássio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
NaOH	Hidróxido de sódio
CaO	Óxido de cálcio



# **1 Introdução**

## **1.1 Relevância e motivação**

É do conhecimento geral a existência de uma quantidade finita de combustíveis fósseis que irão permanecer apenas por mais algumas décadas, sendo por isso necessário o desenvolvimento de fontes alternativas de energia, onde as renováveis devem ter maior expressão. O crescente consumo energético da sociedade humana tem vindo a exaurir as reservas existentes de combustíveis fósseis sejam elas de carvão, gás natural ou petróleo. Reservas essas que levam eras geológicas a serem repostas, não sendo portanto renováveis à escala da vida humana, pelo que o seu esgotamento é inevitável. Este problema, aliado ao preço crescente dos combustíveis fósseis, leva a que seja cada vez mais importante o desenvolvimento e implementação de energias renováveis.

De entre os recursos renováveis disponíveis para a produção de combustíveis alternativos, encontram-se as gorduras e os óleos vegetais.

Os óleos vegetais alimentares, depois de submetidos a processos de fritura, originam um resíduo de difícil gestão: denominado óleo alimentar usado (OAU). Nos últimos anos tem sido fortemente debatida a temática envolvendo este resíduo, em virtude dos impactes ambientais negativos associados à sua deposição incontrolada no meio ambiente.

Na realidade são as práticas inadequadas a jusante da produção de óleos vegetais usados que provocam diversos problemas de poluição ao nível dos diferentes compartimentos ambientais, nomeadamente quando lançados no meio ambiente, através das redes de esgotos ou directamente no solo e meio hídrico. Quando lançados juntamente com as águas residuais nas linhas de águas ocorre a diminuição de oxigénio

presente nas águas superficiais, devido à presença de substâncias consumidoras de oxigénio (matéria orgânica biodegradável), conduzindo a uma degradação da qualidade do meio receptor.

A presença de óleos vegetais usados e outras gorduras pode, igualmente, provocar problemas de maus cheiros e impactes negativos ao nível da fauna e flora envolventes. A descarga nas redes públicas pode, ainda, conduzir a vários problemas de entupimentos, obstrução de canalizações e sistemas de drenagem de edifícios e corrosão das tubagens das redes públicas de esgoto e colectores municipais. Outras consequências da descarga deste tipo de óleos juntamente com as águas residuais domésticas ou industriais são os problemas causados ao nível do desempenho e funcionamento das estações de tratamento de águas residuais (ETAR), que passam a ter que tratar efluentes com maiores concentrações em carência bioquímica de oxigénio (CBO), carência química de oxigénio (CQO) e sólidos suspensos totais (SST), passando a necessitar de um maior número de intervenções de manutenção, e de limpeza.

Porém, a legislação portuguesa, no Decreto-Lei n.º 267/2009 de 29 de Setembro, proíbe actualmente: (i) a descarga deste resíduo nos sistemas de drenagem, individuais ou colectivos, de águas residuais, (ii) a introdução de OAU ou de substâncias recuperadas de OAU na cadeia alimentar, (iii) a deposição em aterro de OAU, nos termos do regime jurídico da deposição de resíduos em aterro, (iv) a mistura de OAU com substâncias ou resíduos perigosos, (v) a realização de operações de gestão de OAU por entidades não licenciadas nos termos do Decreto-Lei n.º 178/2006, de 5 de Setembro e (vi) a utilização, como combustível em veículos, de OAU que não cumpram os requisitos técnicos aplicáveis aos biocombustíveis previstos no Decreto-Lei n.º 62/2006, de 21 de Março.

O mesmo decreto menciona que, a estimativa de produção de óleos alimentares usados (OAU) em Portugal seja da ordem de 43.000 a 65.000 ton/ano, das quais: 62% são geradas no sector doméstico, 37% no sector de hotelaria e restauração (HORECA) e uma fracção residual na indústria alimentar. Esta tipologia de resíduo é definida pela Lista Europeia de Resíduos (LER), transposta pela Portaria n.º 209/2004 de 3 de Março, com o código 20 01 25, como sendo um resíduo não perigoso.

Existem várias possibilidades de valorização de óleos alimentares usados, como seja a produção de sabão, lubrificantes ou biodiesel, com poder de queima praticamente equivalente ao gasóleo. De uma forma geral, a vantagem deste tipo de valorização reside no facto de se pouparem matérias-primas virgens, com implicações óbvias a nível económico e ambiental.

Os resíduos, que são os OAU, constituem uma alternativa renovável de combustível, e esta via de valorização resolvem-se simultaneamente dois problemas ambientais: a reutilização/valorização de resíduos e diminuição da dependência energética de combustíveis fósseis, ao mesmo tempo que são reduzidos os índices de poluição atmosférica.

O biodiesel foi testado nos finais do século XIX quando a Sociedade Otto apresentou na Exposição Universal de Paris um pequeno motor a diesel movido a óleo de amendoim, produzindo resultados satisfatórios. A possibilidade de utilização de combustíveis de origem agrícola, em motores do ciclo diesel é bastante atractiva sob o ponto de vista ambiental, por serem uma fonte renovável de energia e pelo facto do seu desenvolvimento permitir a redução da dependência de importações de petróleo (Ferrari *et al.*, 2005). Já no referido século, Rudolf Diesel afirmou que “o motor a diesel pode ser alimentado com óleos vegetais e pode ajudar no desenvolvimento dos países que o utilizam”.

O biodiesel é a denominação dada a um combustível alternativo limpo, não tóxico, ausente de compostos aromáticos e enxofre. Este combustível quando produzido a partir de OAU é um exemplo de um ciclo ecologicamente correcto, uma vez que um resíduo problemático passa a ser utilizado como matéria-prima renovável. De todos os combustíveis usados nos transportes, o biodiesel é o que apresenta as menores emissões (Rodrigues, 2006).

O referido biocombustível, é produzido a partir de recursos reutilizáveis e pode ser adicionado em qualquer percentagem ao gasóleo de modo a ser usado em motores diesel. De uma forma global, permite a redução de diversos parâmetros para a atmosfera, nomeadamente: partículas (as partículas em suspensão são reduzidas em 30%) e hidrocarbonetos totais (redução em cerca de 93%). Este combustível é, ainda, neutro do ponto de vista do dióxido de carbono, uma vez que o dióxido de carbono libertado é equivalente ao que foi absorvido pela fotossíntese das plantas que lhe deram origem (Caetano *et al.*, 2007). Tratando-se de uma fonte de produção ao alcance de cada país, com um natural contributo para a cota nacional de redução de emissões de gases com efeito de estufa, constitui um forte mecanismo de diminuição da dependência energética face a derivados de combustíveis fósseis.

De uma forma geral, o óleo vegetal (usado ou virgem) reage com um álcool, habitualmente metanol, na presença de um catalisador para produzir glicerol e ésteres alquílicos, que constituem o biodiesel. Nesta reacção, o metanol encontra-se sempre em

excesso para assegurar a conversão de forma rápida e o catalisador usual é o hidróxido de sódio ou de potássio. O subproduto resultante (o glicerol) pode ser utilizado em diversas aplicações na indústria farmacêutica e cosmética.

O uso directo de óleos vegetais como combustível é possível, misturando-os com diesel convencional numa proporção adequada, sendo esta mistura de ésteres estável para usos de curto prazo. Esse processo é simples, envolvendo apenas a mistura, pelo que, o custo do equipamento é baixo. Contudo, para utilizações de longo prazo, o uso directo destes ésteres triglicérideos (óleos) é insatisfatório e impraticável nos motores diesel convencionais, devido: (i) à elevada densidade, (ii) à contaminação ácida, (iii) à formação de ácidos gordos livres, resultando em goma por oxidação e polimerização e deposição de carbono, (iv) à formação de depósitos nos injectores, (v) ao entupimento dos filtros, (vi) ao desgaste provocado pelos ácidos gordos livres e (vii) ao aumento do consumo. Assim, os óleos vegetais são transformados de forma a adquirir propriedades (viscosidade e volatilidade) semelhantes às dos combustíveis fósseis, possibilitando a utilização directa dos combustíveis transformados nos motores diesel convencionais (Ranganathan *et al.*, 2008).

Com efeito, o maior problema do uso directo de óleos vegetais nos motores é a queima incompleta que resulta na formação de depósitos carbonosos e a acumulação de gordura na câmara de combustão, êmbolo e segmentos, podendo obstruir o injector.

Devido a estas condicionantes, uma das vias habitualmente usada é a utilização de ésteres resultantes da transesterificação dos óleos vegetais. Esta reacção consiste em, na presença de um catalisador, fazer reagir sobre os triglicérideos um monoálcool que irá substituir o glicerol, formando três moléculas de éster a partir de cada molécula de triglicérideo, ou seja, conversão do ácido gordo noutro éster do mesmo ácido.

O recurso a ésteres em motores diesel apresenta como principais vantagens: (i) menor viscosidade, (ii) filtragem a temperaturas baixas e (iii) maiores índices de cetano (por vezes superior ao gasóleo).

Alguns ensaios já efectuados permitiram verificar a utilização destes mesmos ésteres em motores ditos normais sem qualquer tipo de modificações. A este facto não é alheia a certificação já de alguns produtos por parte das grandes marcas automóveis que passaram a usar ésteres em alguns dos seus novos modelos.

Os estudos comparativos do gasóleo e biodiesel efectuados ao longo dos últimos anos permitiram concluir que (adaptado de Caetano e Fernandes, 2007; Rodrigues, 2006):

- o arranque a frio é mais fácil com biodiesel do que com gasóleo para temperaturas superiores a 8°C;
- os depósitos na câmara de combustão são menos espessos quando se utiliza o biodiesel em detrimento do gasóleo;
- as superfícies de contacto dos cilindros com os êmbolos permanecem lisas;
- sem qualquer tipo de afinação o consumo aumenta cerca de 5,3% em peso e 3,2% em volume quando comparado com um consumo normal de gasóleo, em virtude da diferença de poder calorífico entre os dois combustíveis.

Todo o desenvolvimento do processo de produção de biodiesel está estritamente relacionado com o tipo de catalisador usado e depende fortemente deste.

Os catalisadores mais utilizados industrialmente são hidróxido de sódio ou de potássio, com rendimentos de produção elevados, tempos de reacção curtos, porém com desvantagens económicas e ambientais, como são exemplo: glicerol com grau de contaminação significativo, impossibilidade de recuperação do catalisador (por inviabilidade económica), processos de purificação do biodiesel obrigatórios e produção de águas residuais com elevada carga orgânica.

Muito trabalho tem sido desenvolvido aos nível da investigação, ao nível do desenvolvimento de catalisadores alternativos, que colmatem os custos ambientais e económicos referidos anteriormente, Os catalisadores enzimáticos são um dos exemplos, e constituem objecto de estudo do presente trabalho, desconhecendo-se até ao momento qualquer aplicação industrial dos mesmos.

## **1.2 Objectivos e estrutura da dissertação**

É objectivo do presente trabalho a valorização de um resíduo – OAU – para produção de biodiesel. A catálise da reacção envolvida na síntese deste biocombustível, constitui uma variável que poderá ser optimizada, e o presente trabalho pretende dar uma contribuição nessa investigação. Assim, será estudado o desempenho de um catalisador enzimático (Novozyme<sup>®</sup> 435), sob condições operatórias específicas. A perda de eficiência/actividade do catalisador será avaliada ao longo das diversas utilizações sucessivas, para finalmente concluir até que ponto o catalisador estudado constitui uma alternativa competitiva aos actualmente usados à escala industrial.

Para alcançar o objectivo proposto, o ponto de partida deste trabalho incidiu na revisão bibliográfica no que concerne à produção de biodiesel, e é apresentada no Capítulo 2. No Capítulo 3 é descrita a planificação experimental levada a cabo ao longo de todo o trabalho. Os resultados experimentais, bem como, a respectiva análise são apresentados no Capítulo 4. Finalmente, no Capítulo 5 são elaboradas as considerações finais alusivas à realização deste estudo e sugestões para trabalho futuros.



## **2 Estado da arte da produção de biodiesel**

### **2.1 Introdução**

Cada vez mais as operações de valorização dos óleos vegetais usados assentam na produção de biocombustíveis. Por esta via resolvem-se simultaneamente diversos problemas ambientais: a reutilização/valorização de um resíduo, a diminuição da dependência energética de combustíveis fósseis, ao mesmo tempo que são reduzidos os índices de poluição atmosférica.

Nos últimos anos, a utilização de óleos vegetais para a produção de combustíveis tem vindo a sofrer um forte incremento face às crises petrolíferas ocorridas e à procura incessante de alternativas ambientalmente credíveis aos combustíveis de origem fóssil.

O uso directo de óleos vegetais ou gorduras animais como combustível nos motores diesel é inadequado, devido à alta viscosidade. Além disso, o seu uso prolongado pode causar sérios problemas ao nível do motor, como por exemplo a deposição e formação de calços. Para ultrapassar estas e outras limitações, foram desenvolvidos diversos processos que permitem a utilização dos óleos vegetais directa ou indirectamente nos motores, nomeadamente:

- Diluição com diesel fóssil;
- Formação de microemulsões com álcoois de cadeia curta;
- Pirólise;
- Transesterificação.

A diluição de óleos vegetais com diesel fóssil é uma das soluções apresentadas para resolver o problema da sua viscosidade, contudo esta opção não é eficaz.

A microemulsão é uma outra alternativa que permite diminuir a viscosidade dos óleos através da adição de solventes, tais como álcoois simples (e.g. metanol, etanol, propanol). Todavia, associado às microemulsões surgem certos problemas, tais como: (i) necessidade de colocar agulha no injector, (ii) formação de depósitos de carbono no motor, (iii) combustão incompleta e (iv) aumento da viscosidade dos óleos lubrificantes.

A pirólise ou craqueamento térmico consiste em alterações químicas causadas pela aplicação de calor para obter compostos mais simples. Os óleos vegetais podem ser craqueados para reduzir a viscosidade e melhorar o índice de cetano<sup>1</sup>. Os produtos do craqueamento incluem alcanos, alcenos e ácidos carboxílicos. As desvantagens deste processo prendem-se com o elevado custo do equipamento e à necessidade de uma unidade de destilação para separar as várias fracções (Ranganathan *et al.*, 2008).

Finalmente, a transesterificação consiste na conversão de triglicerídeos em ésteres alquílicos de ácidos gordos (que constituem o biodiesel), na presença de um álcool de cadeia curta e um catalisador (homogéneo, heterogéneo e enzimático), com glicerol (ou glicerina) como subproduto.

Actualmente, a transesterificação é a via mais usada industrialmente para produção de biodiesel a partir de óleos vegetais. Isto porque, as características dos ésteres de ácidos gordos são muito próximas das do diesel fóssil. Além do mais, os referidos ésteres podem ser queimados directamente em motores diesel; não sendo necessário qualquer modificação ao nível destes motores.

A componente experimental deste trabalho assenta na produção de biodiesel através das reacções de transesterificação e esterificação de um óleo alimentar usado, usando um catalisador enzimático. Consequentemente, o resumo da pesquisa bibliográfica, apresentado neste capítulo, dará ênfase a estes tópicos específicos. Assim, na secção 2.2 apresenta-se as reacções de transesterificação e esterificação; as variáveis determinantes no processo de produção de biodiesel encontram-se elencadas na secção 2.3; as características dos catalisadores enzimáticos bem como as variáveis processuais

---

<sup>1</sup> O índice de cetano é a medida-chave da qualidade de combustão dos combustíveis diesel. Este índice está relacionado com a velocidade de ignição – o período entre o início da injeção de combustível e o início da combustão ([www.bp.com](http://www.bp.com)).

---

que afectam o seu desempenho são discutidas na secção 2.4 e finalmente na secção 2.5 são tecidas as principais conclusões.

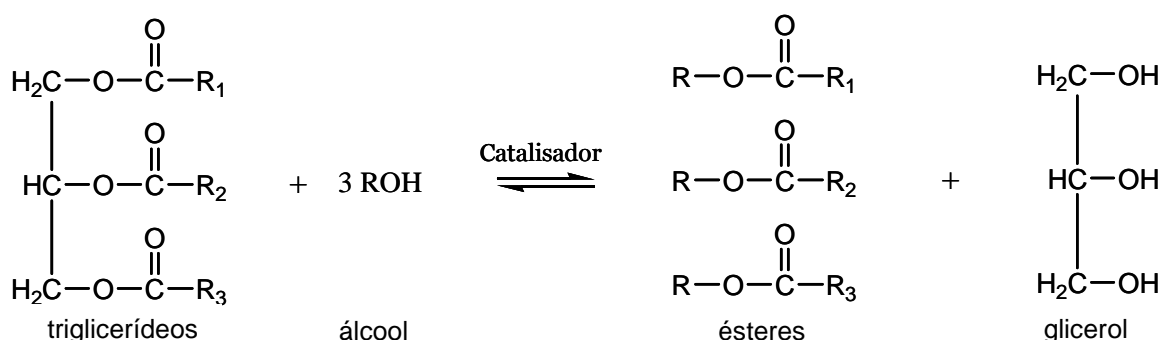
## 2.2 Reacções de transesterificação e esterificação

O processo de produção de biodiesel assenta na transesterificação de óleos vegetais e gorduras, através da utilização de um álcool de cadeia curta e um catalisador. Os óleos vegetais e as gorduras são maioritariamente constituídos por triglicerídeos e pequenas quantidades de mono e diglicerídeos; podendo ainda conter ácidos gordos livres e outros compostos minoritários (glicolípidos, fosfatídeos, etc.).

A reacção química de transesterificação ocorre entre lípidos (triglicerídeos) presentes nos óleos vegetais e gorduras animais e um álcool, na presença de catalisador, para produzir glicerol e ésteres alquílicos de ácidos gordos (usalmente denominados de FAME – *Fatty Acid Methyl Ester* ou FAEE – *Fatty Acid Ethyl Ester*, consoante o álcool seja o metanol ou etanol, respectivamente).

Normalmente a pressão a que se dá a reacção é próxima da atmosférica e para prevenir que o álcool seja o reagente limitante (devido a eventuais perdas por volatilização), este é utilizado em excesso, de modo a garantir a máxima conversão dos triglicerídeos em ésteres.

A forma simplificada da reacção de transesterificação é apresentada na Figura 2.1, onde  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  são cadeias longas de hidrocarbonetos (ácidos gordos).

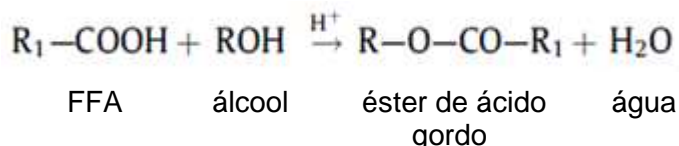


**Figura 2.1** Reacção de transesterificação relativa à produção de biodiesel.

Esta reacção não é elementar, estando envolvidas três reacções sucessivas que decompõem: (i) os triglicerídeos em diglicerídeos (com formação de um éster), (ii) os diglicerídeos em monoglicerídeos (com formação de outro éster) e finalmente (iii) os monoglicerídeos convertem-se no terceiro éster com libertação de uma molécula de glicerol.

A separação dos produtos da reacção (biodiesel e glicerol) é favorecida pela sua diferença de densidades, em que o glicerol pode ser extraído pela base do reactor (fase mais densa) ou por centrifugação.

Os ácidos gordos livres podem também ser convertidos a ésteres (biodiesel), na presença de um álcool através da denominada reacção de esterificação (vide **Figura 2.2**).



**Figura 2.2** Reacção de esterificação por catálise ácida (Leung et al., 2009).

Os álcoois mais utilizados em ambas as reacções, descritas anteriormente, são os de cadeia curta, como o etanol e o metanol, por serem mais reactivos. Este último apresenta baixo custo e é o mais utilizado industrialmente.

A catálise é geralmente empregue nestas reacções de esterificação e transesterificação. Os catalisadores podem pertencer a três grandes famílias: homogéneos (ácidos ou alcalinos), heterogéneos (e. g. resinas, zeólitos) e enzimáticos ou biocatalisadores (livres ou imobilizados). Porém, na esterificação apenas catalisada por agentes ácidos ou alguns tipos de biocatalisadores.

As variáveis processuais, como os teores em água e em ácidos gordos livres, a natureza do álcool e do catalisador, influenciarão o rendimento da produção de biodiesel.

## 2.3 Variáveis determinantes no processo de produção

A produção de biodiesel requer a optimização de diversas variáveis, das quais se destacam, a natureza do álcool e do catalisador, assim como as condições operatórias (e.g. temperatura e agitação).

### 2.3.1 Óleo vegetal (usado)

O maior problema na produção de biodiesel concerne na sua viabilidade económica, que deriva do encargo do óleo vegetal bruto, representando 78% do custo total. Recentemente, esta situação foi agravada devido ao aumento do preço das matérias-primas agrícolas na União Europeia. Portanto, é inegável que a matéria-prima será uma variável crucial que afectará o preço do biodiesel no mercado global.

---

Neste contexto, os óleos alimentares usados (OAU) são uma matéria-prima alternativa promissora, aos óleos vegetais virgens, na produção de biodiesel, porque são mais baratos. Por outro lado, com a sua valorização não será necessário suportar os custos decorrentes da sua eliminação e/ou tratamento.

O uso desta matéria-prima contribui para a redução da necessidade do uso intensivo de solo pelas chamadas culturas energéticas, i. e. culturas de oleaginosas. Assunto polémico e controverso, muito debatido nos meios de comunicação social e em diversas comunicações científicas.

As quantidades de OAU disponíveis para a produção de biodiesel na Europa são relativamente elevadas. Segundo Bautista *et al.* (2009), a quantidade de OAU recolhida na Europa para reciclagem, é estimada em cerca de 0,7-1,0 milhões de toneladas por ano. Tradicionalmente, estes óleos eram usados como um aditivo na ração animal. Contudo, durante a fritura de óleos vegetais são produzidos compostos perigosos (ácidos gordos polinsaturados), e a União Europeia ciente deste problema proibiu, em 2002, a sua incorporação na composição da ração animal.

No processo de fritura, o óleo é aquecido a temperaturas da ordem de 160-190°C durante períodos relativamente longos. Por vezes, devido razões económicas, o mesmo óleo é usado inúmeras vezes, o que acarreta diversas alterações físicas e químicas, que podem ser mais ou menos significativas consoante a sua natureza. Algumas das alterações físicas que se observam são: aumento da viscosidade, aumento do calor específico, alteração da tensão superficial e da cor (Lam *et al.*, 2010). As reacções que podem ocorrer são de três tipos: oxidação, polimerização e hidrólise.

Os triglicerídeos, que estão presentes no óleo, são compostos orgânicos oxidáveis. A oxidação, acelerada pela temperatura e pela luz, provoca o envelhecimento do óleo devido ao contacto com o oxigénio atmosférico. Quando o óleo é constituído por moléculas insaturadas, é mais propício a ocorrência da sua oxidação, bem como a produtos degradados (e. g. hidroperóxidos, aldeídos e cetonas).

A polimerização é uma reacção química onde os ácidos gordos insaturados – devido à influência do calor, metais pesados (Cu, Fe) ou luz e por meio da quebra da ligação dupla – reagem para formar dímeros (molécula composta por duas subunidades idênticas ou monómeros ligados entre si) e polímeros de triglicerídeos. Como consequência da polimerização, o peso molecular do óleo aumenta, provocando o aumento da sua viscosidade.

A hidrólise de triglicerídeos ocorre quando é produzido vapor de água durante a preparação dos alimentos. Parte da água é rapidamente evaporada, mas outra parte dissolve-se no óleo e induz a sua clivagem para originar ácidos gordos, glicerol, monoglicerídeos e diglicerídeos (Lam *et al.*, 2010).

Em suma, os produtos formados durante a fritura são polímeros, dímeros, triglicerídeos oxidados (hidroperóxidos, aldeídos e cetonas), diglicerídeos e ácidos gordos.

Felizardo *et al.* (2006) afirmam que óleos com elevada concentração de ácidos gordos livres, ou seja, valor ácido superior a 2 mg KOH/g OAU, não podem ser usados directamente para produzir biodiesel, via catálise homogénea alcalina sendo aconselhável realizar-se um pré-tratamento. Os ácidos gordos livres têm de ser esterificados numa etapa prévia à da reacção de transesterificação por catálise alcalina. Caso contrário, a saponificação impedirá a separação do éster do glicerol, reduzindo o rendimento e a taxa de formação de FAME, devido ao consumo do catalisador. Este pré-tratamento consiste numa reacção, catalisada por um ácido, com um álcool com vista a transformar os ácidos gordos livres nos seus ésteres correspondentes.

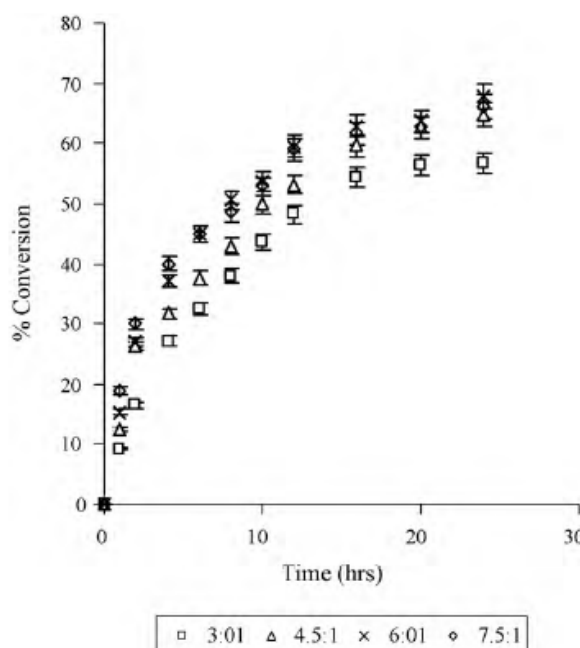
O problema da presença de ácidos gordos livres não se coloca na biocatálise, onde existem enzimas capazes de catalisar ambas as reacções: esterificação e transesterificação.

### **2.3.2 Álcool**

Muitos investigadores reconhecem que um dos factores mais importantes que afecta o rendimento da produção de biodiesel é a razão molar álcool:triglicerídeos. Pela estequiometria, a reacção de transesterificação requer 3 mol de álcool para 1 mol de triglicerídeos, para produzir 3 mol de ésteres de ácidos gordos e 1 mol de glicerol. Normalmente, é usado um excesso de álcool na produção de biodiesel, para maximizar a conversão dos óleos ou as gorduras em ésteres, visto que se trata de uma reacção reversível (Shimada *et al.*, 1999). Antczak *et al.* (2009) referem que um pequeno excesso de álcool conduz a um elevado rendimento na síntese de biodiesel. Todavia, aumentando a quantidade de álcool para além de um valor óptimo, não vai aumentar o rendimento, mas sim o custo na recuperação do álcool.

A maior parte dos estudos de transesterificação homogénea alcalina de óleos vegetais usados relatam que a máxima conversão de ésteres é alcançada com a razão molar álcool:óleo de 6:1 (ver por exemplo Meng *et al.*, 2008; Encinar *et al.*, 2005).

Sonare *et al.* (2010) estudaram a razão molar metanol:óleo na transesterificação do óleo de girassol usado com metanol, catalisada pela Lipozyme RM IM. Os resultados obtidos são apresentados na figura seguinte:



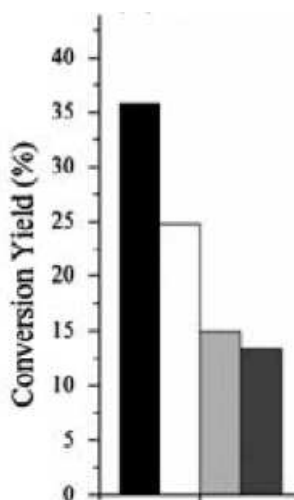
**Figura 2.3** Efeito da razão molar metanol:óleo no rendimento da reacção de transesterificação do óleo de girassol usado com metanol, catalisada pela Lipozyme RM IM (Sonare and Rathod, 2010).

Na figura anterior, observa-se que nas condições operatórias do referido estudo, a razão molar metanol:óleo óptima é de 4,5:1.

Halim *et al.* (2008) observaram que numa reacção de transesterificação enzimática com óleo de palma usado, a 40°C, 160 rpm e 12 h de reacção a razão molar álcool:óleo ideal era de 4:1. Para razões molares álcool:óleo superiores a produção de FAME não registou qualquer aumento significativo.

Na diversa literatura consultada (e.g. Maceiras *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2006, Halim *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2006, Rodrigues *et al.*, 2008, etc.), não existe consenso em relação à óptima razão molar álcool:óleo a usar na transesterificação enzimática, contudo todos os autores. Este óptimo está directamente relacionado com diversos factores, como: matéria-prima, álcool, natureza da enzima e temperatura e tem implicações directas na conversão de triglicérideos em ésteres e no tempo da reacção.

Outro factor importante que influencia a reactividade de um álcool é o comprimento da cadeia de átomos de carbono. Existem diversos tipos de álcool que podem ser usados na reacção de transesterificação, sendo os mais utilizados os seguintes: metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico. Os diferentes álcoois apresenta algumas diferenças em relação à cinética da reacção, contudo o rendimento final de ésteres permanece mais ou menos inalterável (Refaat, 2010). Portanto, a escolha do álcool é feita tendo em conta o seu custo e a sua performance. Na Figura 2.4 são apresentados os resultados obtidos por Rodrigues *et al.* (2008), onde foi avaliada a influência deste parâmetro no rendimento em ésteres. Para tal foram testados álcoois de cadeia curta e longa, na catálise enzimática do óleo de soja, com as seguintes condições operatórias: 30°C, razão molar álcool:óleo de 7,5:1, 15% de enzima Novozyme® 435, 4% de água e tempo reaccional de 6h.



**Figura 2.4** Influência do tipo de álcool na conversão dos triglicerídeos. Representado a preto está o metanol, a branco o etanol, a cinzento claro o propanol e a cinzento escuro o butanol (Rodrigues *et al.*, 2008).

Pela figura anterior, é possível observar que o maior rendimento é alcançado na metanólise<sup>2</sup>, sendo inferior para os outros álcoois. Esta diminuição é proporcional ao aumento da cadeia de átomos de carbono do álcool. A enzima usada torna-se mais activa na presença de álcoois de menor peso molecular, o que facilita a sua capacidade de catalisar reacções de metanólise ou etanólise.

<sup>2</sup> Metanólise – reacção de transesterificação ocorrida na presença de metanol.



Pelos motivos expostos, o metanol e o etanol são os álcoois utilizados mais frequentemente. O metanol é normalmente usado devido ao seu baixo custo e às suas vantagens químicas. Contudo, devido ao seu baixo ponto de ebulição, existe um elevado risco de explosão associado aos vapores, que são incolores e inodoros.

O etanol tem a vantagem de provir de fontes renováveis, podendo ser obtido através de recursos renováveis da agricultura, alcançando assim total independência energética face aos álcoois derivados do petróleo. Além da sua natureza inteiramente agrícola, o átomo de carbono adicional (face ao metanol), provoca um ligeiro aumento no número de cetano. Em relação à sua extracção/recuperação, o etanol é preferível face ao metanol, devido ao seu elevado poder de dissolução dos óleos. A tabela seguinte apresenta resumidamente as vantagens e desvantagens destes dois álcoois.

**Tabela 2.1** Principais vantagens e desvantagens da utilização de metanol e etanol na reacção de transesterificação.

Álcool	Vantagens	Desvantagens
<b>Metanol</b>	Mais reactivo	Bastante tóxico
	Menor tempo de reacção	Origem fóssil (maioritariamente)
	Barato	Pouco solúvel no óleo
<b>Etanol</b>	Menos tóxico	Necessidade de temperatura mais elevada
	Origem renovável	Necessidade de maior razão molar álcool:óleo

Em suma, a natureza do álcool não só influencia a velocidade da reacção, ou o rendimento atingido ao final de um certo tempo reaccional, como também a posterior separação das fases biodiesel/glicerol. Quando se trata da catálise enzimática, na selecção do álcool deve pesar também o factor da eventual toxicidade do mesmo para a enzima.

### 2.3.3 Catalisador

A reacção de transesterificação é bastante lenta, portanto recorre-se normalmente à utilização de um agente que a acelere. Este agente é denominado de catalisador, sendo uma substância que aumenta a velocidade de uma reacção, sem sofrer alterações permanentes na sua estrutura. O catalisador a usar deve ser adequado ao tipo de óleo a

transesterificar, uma vez que este influencia tanto o rendimento como a velocidade da reacção.

Na bibliografia encontram-se vários tipos de catalisadores já estudados para a produção de biodiesel. Estes agrupam-se em três grandes famílias: homogéneos, heterogéneos e enzimáticos, e deste modo pode-se falar em processos de catálise homogénea, catálise heterogénea e catálise enzimática.

Na tabela seguinte apresentam-se vantagens e desvantagens de diversos tipos de catalisadores.

**Tabela 2.2** Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores usados na produção de biodiesel (Leung et al., 2009).

Tipo		Exemplo	Vantagens	Desvantagens
Alcalino	Homogéneos	NaOH, KOH	Elevada actividade catalítica, baixo custo, cinética favorável	Exige baixo teor de ácidos gordos livres, condições anidras, formação de emulsões, águas residuais da purificação, não recuperável
	Heterogéneos	CaO, CaTiO <sub>3</sub> , CaZnO <sub>3</sub> , CaO-CeO <sub>2</sub> , CaMnO <sub>3</sub> , Ca <sub>2</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , KOH/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , KOH/NaY, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /KI, zeólito ETS-10	Não corrosivo, reciclável, poucos problemas de eliminação, facilidade de separação, maior selectividade, vida útil do catalisador mais longa	Exige baixo teor de ácidos gordos livres, condições anidras, águas residuais da purificação, necessidade e elevada razão molar álcool:óleo, temperatura de reacção e pressão elevadas, limitações de difusão, elevado custo
Ácido	Homogéneos	Ácido sulfúrico concentrado	Catalisa a esterificação e a transesterificação em simultâneo, evita a formação de sabões	Corrosão do equipamento, águas residuais da neutralização, difícil de reciclar, elevada temperatura de reacção, longos tempos de reacção, fraca actividade catalítica na transesterificação
	Heterogéneos	ZnO/I <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> /SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , TiO <sub>2</sub> /SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Catalisa a esterificação e a transesterificação em simultâneo, reciclável, amigo do ambiente	Baixa concentração, microporosidade baixa, limitações de difusão, alto custo
Enzimas		Lipase <i>Candida antarctica</i> , Lipase <i>Rhizomucor mieher</i> , etc	Catalisa a esterificação e a transesterificação em simultâneo, podendo ser recuperáveis se estiverem imobilizadas, evita a formação de sabões, não poluente, fácil purificação	Caro, desnaturação

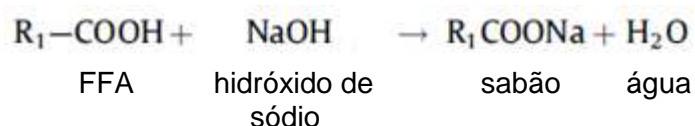
De seguida abordar-se-á as famílias de catalisadores mencionadas na tabela anterior, dando-se mais ênfase à catálise enzimática, visto o presente trabalho recair no estudo de um catalisador desta família.

### 2.3.3.1 Catálise homogénea

A utilização de catalisadores homogéneos na produção de biodiesel é uma técnica que remonta a várias décadas, principalmente devido ao seu baixo custo e alta reactividade. Este processo catalítico pode ocorrer via alcalina ou ácida, como se pode constatar na Tabela 2.2. O ácido comumente usado é o sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e as bases são o hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) e o hidróxido de potássio ( $\text{KOH}$ ). Industrialmente a catálise alcalina é a mais utilizada, pois estes materiais são económicos e o processo de transesterificação ocorre a baixas temperaturas ( $65^\circ\text{C}$ ) e à pressão atmosférica sendo a taxa de conversão elevada. No entanto, estes catalisadores são altamente higroscópios e absorvem água do ar durante o armazenamento.

A taxa de reacção na catálise homogénea alcalina é 4000 vezes superior quando comparada com a catálise homogénea ácida. Todavia, o uso de catalisadores homogéneos alcalinos está limitado a óleos vegetais refinados com teor de ácidos gordos livres inferior a 0,5% ou valor ácido inferior a 1 mg  $\text{KOH/g}$  (Lam *et al.*, 2010). A literatura reporta que os catalisadores alcalinos podem tolerar teores de ácidos gordos livres mais elevados (inferior a 2%).

Uma vez que o teor médio de ácidos gordos livres nos OAU é de 6%, a catálise homogénea alcalina à partida seria uma via a não adoptar, porque os catalisadores alcalinos reagem com os ácidos gordos livres e formam sabão. A figura que se segue mostra a reacção típica entre um ácido gordo livre e um catalisador alcalino (neste caso,  $\text{NaOH}$ ).

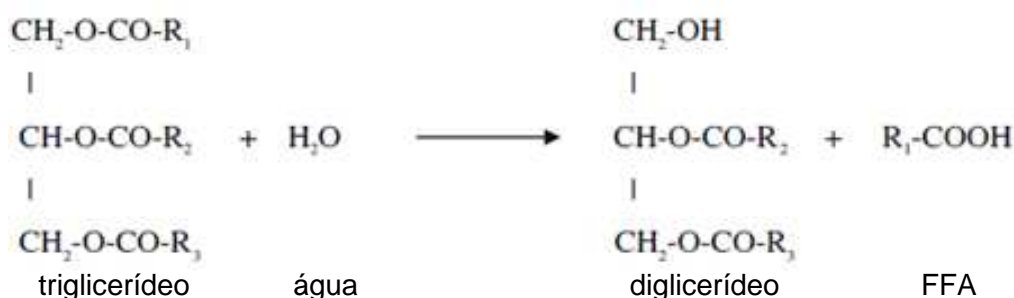


**Figura 2.5** Reacção de saponificação do catalisador (hidróxido de sódio) e do ácido gordo livre formando sabão e água (Leung *et al.*, 2009).

Esta reacção é indesejada porque consome o catalisador, não ficando este disponível para a sua função de acelerar a reacção de transesterificação. Além disso, a existência de excessivo sabão nos produtos, pode reduzir drasticamente o rendimento da reacção e inibir o processo subsequente de purificação do biodiesel, ou seja, dificulta a separação dos ésteres do glicerol.

À parte disso, a água existente nos óleos e gorduras ou formada durante a reacção de saponificação, retarda a reacção de transesterificação através da reacção de hidrólise;

podendo hidrolisar os triglicerídeos a diglicerídeos e formar mais ácidos gordos livres. Na Figura 2.6 está patente a reacção típica de hidrólise.



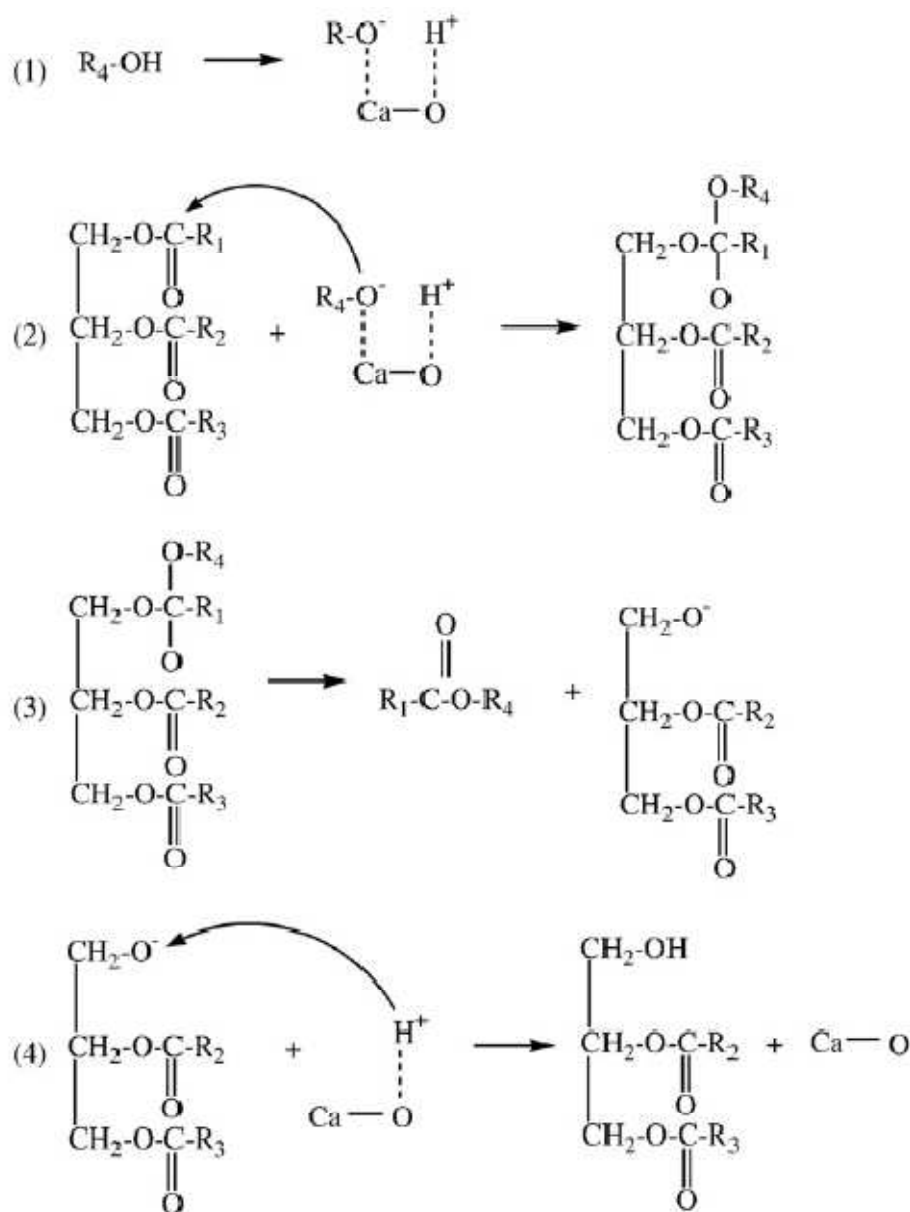
**Figura 2.6** Reacção de hidrólise (Leung *et al.*, 2009).

É necessário um pré-tratamento ao óleo vegetal, quando o teor em ácidos gordos livres ultrapassa os 0,5%, e se pretende usar catalisadores como o NaOH ou o KOH. O pré-tratamento consiste na esterificação dos ácidos gordos livres, usando um catalisador ácido, normalmente o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este catalisador é também capaz de catalisar a reacção de transesterificação, porém o incremento na taxa de reacção não é competitivo com o conseguido com os catalisadores alcalinos da mesma família.

### 2.3.3.2 Catálise heterogénea

Na produção de biodiesel, os catalisadores heterogéneos surgiram como uma alternativa aos homogéneos, sendo possível a sua recuperação. Estes são menos corrosivos, fáceis de manusear e podem ser separados (por simples filtração) no fim da reacção e reutilizados.

Tal como os catalisadores homogéneos, estes também podem ser alcalinos ou ácidos. Os catalisadores heterogéneos alcalinos podem ser zeólitos alcalinos, óxidos de metais alcalino-terrosos e hidrotalcites. Destes, os óxidos de metais alcalino-terrosos especialmente o óxido de cálcio (CaO), atraiu mais atenção devido à sua elevada resistência, baixa solubilidade no metanol e pode ser sintetizado a partir de fontes baratas como o hidróxido de cálcio e calcário (Helwani *et al.*, 2009). Na figura seguinte é apresentado o mecanismo do CaO como catalisador heterogéneo na reacção de transesterificação.



**Figura 2.7** Mecanismo do catalisador heterogéneo alcalino, CaO, na transesterificação de triglicerídeos (Lam et al., 2010).

Na Figura 2.7,  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  representam a cadeia de carbono dos ácidos gordos e  $R_4$  representa o grupo alquílico do álcool. A etapa (1) traduz a separação do protão do metanol pelos sítios básicos para formar o anião metóxido. Em (2) o anião metóxido ataca o carbono do grupo carbonílico, na molécula de triglicerídeos, originando a formação do alcóxicarbonilo intermédio. No ponto (3) está patente o alcóxicarbonilo intermédio transformado numa molécula mais estável: FAME e anião de diglicerídeo. Por fim, em (4) o catião metóxido atrai o anião de diglicerídeo conduzindo à formação do diglicerídeo. Esta sequência é repetida duas vezes, para  $R_2$  e  $R_3$  (Lam *et al.*, 2010).

Acredita-se que os catalisadores heterogêneos ácidos têm grande potencial para substituir os catalisadores homogêneos ácidos. As vantagens da utilização de catalisadores sólidos ácidos são as seguintes: (i) insensíveis ao teor de ácidos gordos livres, a esterificação e transesterificação ocorrem em simultâneo, (ii) a fase de lavagem do biodiesel não é necessária, (iii) fáceis de separar do meio reaccional, resultando num menor nível de contaminação do produto, (iv) fáceis de regenerar e reutilizar e (v) reduzem os problemas de corrosão, mesmo na presença de espécies ácidas.

Contudo, os esforços na exploração de catalisadores ácidos sólidos de transesterificação são limitados devido às expectativas pessimistas sobre a possibilidade de baixas taxas de reacção e reacções secundárias indesejadas.

A grande vantagem desta família de catalisadores é o seu elevado tempo de vida.

#### 2.3.3.3 *Catálise enzimática*

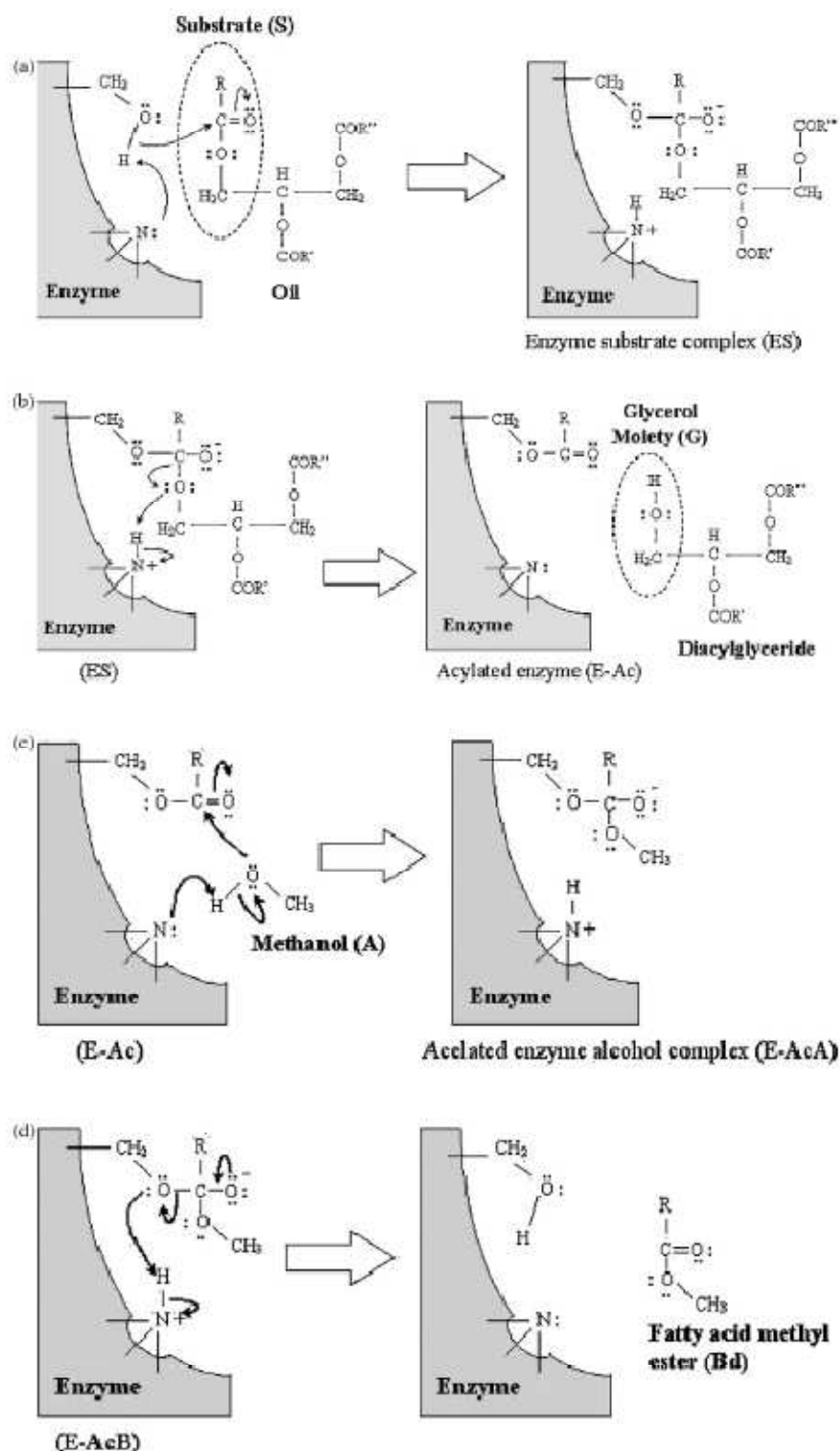
As enzimas são proteínas que actuam como catalisadores normalmente em sistemas biológicos com alta especificidade de reacção. Provavelmente sem a actuação enzimática, a vida não existiria da forma como a conhecemos.

“Uma enzima geralmente catalisa uma única reacção química ou um conjunto de reacções intimamente relacionadas. As reacções colaterais, que levam ao desperdício de formação de produtos secundários, raramente ocorrem. O grau de especificidade para o substrato é normalmente alto e, às vezes, absoluto” (Neto, 2002).

As lipases são um tipo de enzimas classificadas como hidrolases que actuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis os seus melhores substratos. São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Inicialmente, eram obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado, quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os recentes avanços registados na tecnologia do DNA (ácido desoxirribonucleico) têm permitido aos fabricantes de enzimas colocar no mercado lipases microbianas com actividade bem elevada, a um custo bem mais acessível. Estima-se que a disponibilidade comercial de lipases listou enzimas de 34 fontes diferentes, incluindo 18 a partir de fungos e 7 de bactérias (Castro *et al.*, 2004). A utilização de enzimas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de cem anos, apesar deste potencial ter sido mais intensamente explorado a partir da

segunda metade da última década. Durante esse período, foram estudadas um grande número de reacções catalisadas por enzimas, tornando-se familiar aos químicos orgânicos. As lipases termoestáveis são particularmente usadas na síntese de ésteres e amidas, sendo também empregues nos processos produtivos de álcoois primários e secundários, bem como ácidos carboxílicos (Gonçalves *et al.*, 2008). Têm sido utilizadas diferentes lipases como biocatalisadores na produção de biodiesel, nomeadamente a *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*, *Thermomyces lanuginosus*, *Mucor miehei* e *Rhizopus oryzae*, mas não existem muitos estudos que envolvam o uso de OAU (Maceiras *et al.*, 2009). Os sítios activos presentes nas lipases têm sido estudados por técnicas químicas e raio-X, pelas quais foram identificados dois grupos funcionais particularmente importantes nos processos catalíticos: o grupo hidroxilo, que actua como um nucleófilo, e o átomo de hidrogénio presente no grupo amina, que aceita protões e os liberta posteriormente durante a reacção. Na Figura 2.8 está representado o mecanismo envolvido na reacção de transesterificação por acção enzimática utilizando metanol (Al-Zuhair *et al.*, 2008).





**Figura 2.8** Mecanismo de produção de ésteres metílicos por catálise enzimática (Al-Zuhair et al., 2007).

O passo (a) da referida figura representa a adição nucleófila para formar o complexo enzima-substrato, onde o nucleófilo é o oxigénio do grupo O-H da enzima. Em (b), o

protão transferido do ácido conjugado da amina para o átomo de oxigénio do grupo alquilo do substrato, forma glicerol. Se o triglicerídeo fosse o substrato inicial, formar-se-ia um diglicerídeo, se o substrato inicial fosse um diglicerídeo, formar-se-ia um monoglicerídeo e assim sucessivamente. No passo (c) o átomo de oxigénio de uma molécula de metanol é adicionado ao átomo de carbono da ligação C=O do intermediário acil da enzima para formar o complexo acilado enzima-álcool. Por fim, em (d) o átomo de oxigénio do complexo enzima é eliminado, e um protão é transferido do ácido conjugado da amina, resultando em ésteres metílicos de ácidos gordos. Estes passos representam o mecanismo denominado de Ping-Pong Bi Bi.

As enzimas podem ser utilizadas na sua forma livre (em solução) ou imobilizadas em suporte sólido. A imobilização tem a vantagem de que a enzima pode ser recuperada e posteriormente reutilizada. Vários investigadores (Shimada *et al.*, 1999, Maceiras *et al.*, 2009 e Ognjanovic *et al.*, 2009) relataram que a enzima Novozyme® 435 (lipase *C. antarctica* B imobilizada em resina acrílica) disponível comercialmente foi o catalisador mais eficaz das várias lipases testadas para a produção de biodiesel

Os catalisadores enzimáticos tornaram-se atractivos, porque os problemas da formação de sabões e do teor de água, existentes na catálise homogénea alcalina não se colocam e o processo de purificação do biodiesel é mais simples de realizar. As gorduras, contendo triglicerídeos e ácidos gordos livres, podem ser convertidas por via enzimática a biodiesel, num processo de uma única etapa, porque as lipases catalisam ambas as reacções de transesterificação e esterificação, a temperaturas inferiores em relação a outras técnicas, mas exigindo maiores tempos de reacção. No entanto, são menos usadas comercialmente, porque possuem custos e tempos de reacção elevados e também devido ao efeito de inibição que é observado aquando da utilização de metanol.

As maiores alíquotas admissíveis de álcool adicionado a misturas de reacção de transesterificação dependem da tolerância da enzima à concentração de álcool e de água. A presença simultânea de metanol e água pode acelerar a desnaturação da enzima, enquanto que em sistemas contendo etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol é necessária a presença de pequenas quantidades de água.

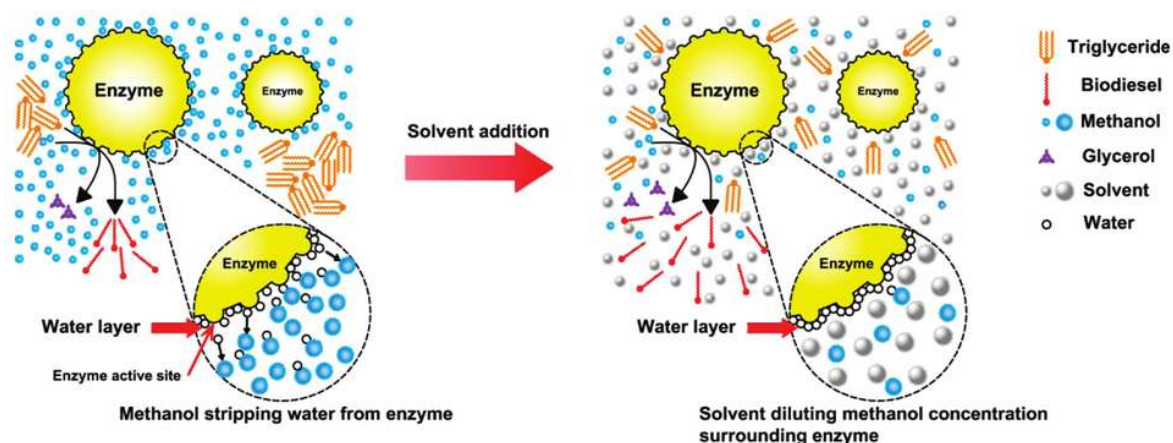
A estrutura e concentração do álcool afectam a estabilidade operacional da enzima, isto é, influenciam o tempo que a enzima é capaz de catalisar. A selecção do sistema reaccional (com ou sem solvente orgânico) é baseada na estabilidade operacional da enzima (geralmente usa-se solventes orgânicos para proteger, de certa forma, a enzima da desnaturação causada pelo álcool) (Antczak *et al.*, 2009).

O uso de excesso de álcool é necessário devido a diversos motivos, tais como: garantir elevada taxa de reacção, minimizar as limitações de difusão e manter em solução o glicerol formado durante a reacção. De acordo com Rodrigues *et al.* (2008), elevadas razões molares de álcool:óleo aumentam a polaridade do meio e o rendimento da reacção, o que é associado à desactivação dos biocatalisadores, em particular quando o álcool é insolúvel na mistura de reacção. O metanol e os óleos vegetais formam uma solução quando a razão molar é cerca de 1:1 (a 40°C) (Antczak *et al.*, 2009).

Os álcoois de cadeia curta, especialmente o metanol, têm baixa solubilidade em óleos. Portanto, uma nova fase líquida aparece no sistema reaccional em concentrações moderadas, levando à inactivação da enzima e por conseguinte, diminuindo o rendimento em ésteres. Este problema foi superado através da adição de metanol de uma forma faseada, i. e., por estágios, desde que a solubilidade deste álcool nos ésteres alquílicos seja superior à do óleo (Royon *et al.*, 2007).

Em alternativa, existe outro método que permite contornar o problema da toxicidade do álcool, sendo ele o uso de um solvente orgânico no meio reaccional. Esta prática aumenta a solubilidade do álcool (portanto, pode ser usado em concentrações mais elevadas), protege a enzima da inactivação e assegura a transesterificação enzimática num passo. A imiscibilidade dos dois reagentes (metanol – hidrofílico e triglicerídeos – hidrofóbicos) resulta na formação de uma interface que origina resistência à transferência de massa e a forte polaridade do metanol, que tende a retirar a água do sítio activo da enzima, conduzem à sua desactivação (Fu *et al.*, 2009). A adição de um solvente orgânico ao meio reaccional deverá simultaneamente ultrapassar duas limitações: (i) aumentar a solubilidade do óleo e do metanol e (ii) limitar a concentração de metanol que rodeia a enzima (vide Figura 2.9). O solvente neste caso deverá funcionar como um agente emulsionante dos dois reagentes (metanol e óleo).

A utilização de solventes na produção enzimática de biodiesel é mencionada como sendo inconveniente, devido à recuperação destes após conclusão da reacção, pois implica a necessidade de uma unidade de extracção. Contudo, esta prática é comum na indústria química, após a produção de biodiesel por catálise homogénea, onde o metanol usado em excesso é recuperado. Assim, a uma escala industrial, os solventes podem ser recolhidos juntamente com o metanol após a reacção enzimática.



**Figura 2.9** Micro reacção sem e com solvente, onde está patente o efeito do metanol na água, na presença/ausência de solvente (Fu and Vasudevan, 2009).

Até ao momento, foram testados diversos solventes, com distintos coeficientes de partição ( $\log P$ ), parâmetro fundamental que descreve a influência da polaridade-hidrofobicidade dos solventes orgânicos na catálise enzimática. O melhor solvente orgânico garante boa solubilidade dos substratos/reagentes e mantém a actividade da enzima. Em muitos casos, o sistema óptimo para a reacção enzimática consiste na mistura dos já mencionados solventes orgânicos.

De entre os solventes orgânicos utilizados na síntese enzimática do biodiesel os considerados mais aconselháveis são os apresentados na Tabela 2.3.

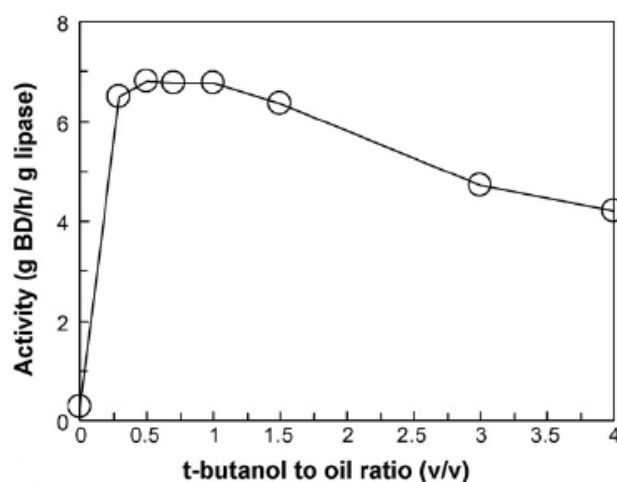
**Tabela 2.3** Coeficientes de partição dos solventes mais utilizados na reacção de transesterificação (Antczak et al., 2009).

Solventes	$\log P$
acetona	-0,24
tert-butanol	0,83
ciclohexano	3,1
éter de petróleo 40-60	3,2
éter de petróleo 60-120	3,5-4,3
n-hexano	3,5
n-heptano	4,0

Os solventes com valor baixo de  $\log P$ , exibem forte hidrofilicidade, desencadeando a desactivação da enzima.

Nie et al., (2006) não aconselham o uso de um solvente orgânico com valor de  $\log P$  inferior a 2, pois o solvente pode remover a água que rodeia a enzima, presente numa camada microaquosa, e assim perturbar a sua actividade.

A Figura 2.10 apresenta o efeito da quantidade de tert-butanol na actividade da enzima sob as seguintes condições: razão molar metanol:óleo de palma refinado=3:1, 0,4 g Novozyme® 435, 40°C, 190 rpm e tempo de reacção de 2 h.



**Figura 2.10** Efeito da quantidade de tert-butanol na actividade da enzima Novozyme® 435 (Talukder et al., 2009).

Verifica-se que, quando não é utilizado o referido solvente, a actividade da enzima é bastante baixa, atingindo o máximo quando a razão volumétrica t-butanol:óleo é 0,5 v/v. Contudo, a actividade da enzima decresce progressivamente quando a razão volumétrica tert-butanol:óleo ultrapassa a unidade. Tal facto pode dever-se ao efeito da diluição dos reagentes. Da bibliografia consultada, é possível constatar que a razão volumétrica solvente:óleo possui valores óptimos distintos, como se verifica, por exemplo, através dos ensaios realizados por Li et al. (2006).

Em diversos estudos realizados verificou-se que a utilização de solventes orgânicos hidrofílicos (tert-butanol, acetona, etc) originam rendimentos de FAME elevados, mas no caso de solventes hidrofóbicos (heptano, isoctano, hexano, etc.) este rendimento é inferior. Numa reacção de transesterificação os compostos hidrofílicos como o metanol e o glicerol, são imiscíveis no meio reaccional hidrofóbico. O metanol é insolúvel na mistura de óleo e em solventes hidrofóbicos. Embora o metanol seja facilmente solúvel nos

solventes hidrofílicos, o óleo é imiscível nesses solventes o que originará baixo rendimento de FAME. Como o tert-butanol é um solvente moderadamente hidrofílico pode solubilizar o óleo, o metanol e o glicerol; deste modo, melhora a actividade catalítica da enzima conduzindo a maior rendimento de FAME (Halim and Kamaruddin, 2008). O exposto é descrito por outros autores como, Sonare and Rathod (2010), Li *et al.* (2006), Antczak *et al.* (2009), entre outros.

Royon *et al.* (2007) relataram que a inibição causada pelo metanol não dissolvido é eliminada pela adição de t-butanol ao meio reaccional, proporcionando também um ligeiro aumento na taxa de reacção e no rendimento de ésteres, sendo assim o processo enzimático melhorado. O t-butanol dissolve o metanol e o glicerol e não é um substrato para as lipases, porque estes não reagem com os álcoois terciários.

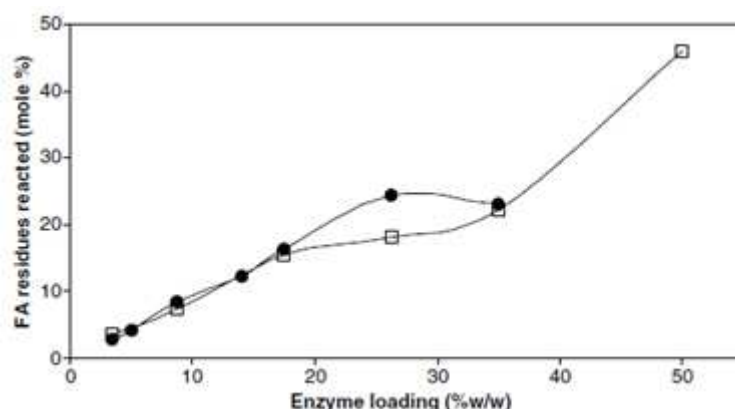
Diversos autores têm demonstrado que existem benefícios na utilização de sistemas sem solvente em comparação com o uso de solventes orgânicos, incluindo a redução de custos e a melhoria no controlo do processo. Segundo Ognjanovic *et al.* (2009), apesar dos rendimentos obtidos nos sistemas com solventes orgânicos sejam elevados, a concepção eficiente do sistema reaccional sem solvente com lipase imobilizada, possuindo elevada actividade e melhor estabilidade na síntese de biodiesel, ainda tem alguns problemas por colmatar.

Na bibliografia consultada (e. g. Hernandez-Martin *et al.*, 2008, Watanabe *et al.*, 2000, Vieira *et al.*, 2009) verifica-se que as enzimas comerciais mais usadas na produção de biodiesel pertencem à família das Lipozyme<sup>®</sup> e Novozyme<sup>®</sup>, sendo esta última a preferível, pois normalmente consegue-se conversões mais elevadas; contudo é a enzima mais cara.

A quantidade de enzima necessária na reacção de transesterificação é um factor crucial para o sucesso a nível industrial. A Figura 2.11 apresenta os resultados obtidos por Hernandez-Martin *et al.* (2008), em ensaios que pretendiam avaliar a influência das quantidades de Novozyme<sup>®</sup> 435 (com base na massa de óleo) na conversão de ésteres. Os ensaios decorreram com adição de metanol em três estágios, de acordo com as seguintes condições operatórias: 25°C, 1h, agitação orbital de 200 rpm e 2 g de óleo de soja.

Pela análise da referida figura verifica-se que, quando a razão molar etanol:óleo é de 1:1 a maior conversão de ésteres é alcançada quando a razão molar de catalisador é cerca de 25%, neste caso, o etanol é o reagente limitante e consequentemente, o rendimento

diminui. Aumentando a razão mássica etanol:óleo, a maior conversão de ésteres é alcançada quando a razão mássica de catalisador é de 50%.



**Figura 2.11** Efeito da razão mássica de Novozyme® 435 na reacção de transesterificação. Círculos, razão molar etanol:óleo de 1:1 e quadrados, razão molar etanol:óleo de 4,5:1 (Hernandez-Martin and Otero, 2008).

Em trabalhos realizados por outros autores (Sonare & Rathod, 2010, Li *et al.*, 2006, Modi *et al.*, 2007, Deng *et al.*, 2003, Gao *et al.*, 2006) utilizando esta e outras enzimas, verificou-se ser possível alcançar elevadas conversões de triglicerídeos em ésteres, com menores massas de catalisador.

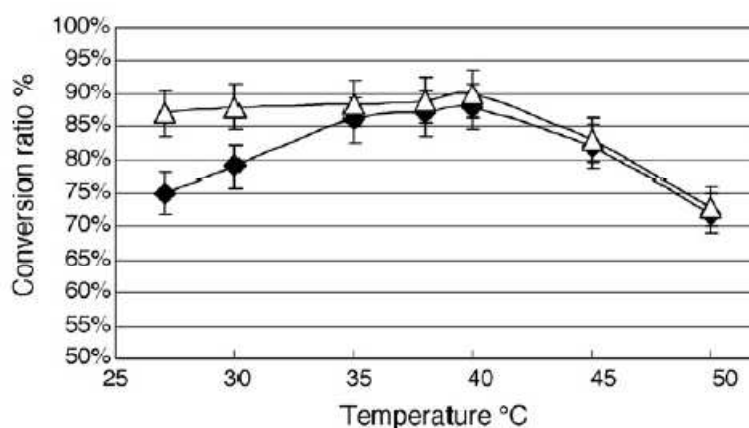
Em suma, a produção de biodiesel usando catalisadores enzimáticos elimina as desvantagens dos processos alcalinos devido à obtenção de um produto de elevada pureza com menos ou mesmo sem nenhuns problemas de operação a jusante. Segundo, Ranganathan *et al.* (2008) o método de produção de biodiesel através da catálise enzimática já foi patenteado por Haas (1997), mas não foi ainda implementado a uma escala industrial devido a alguns constrangimentos como a inibição da enzima pelo metanol, perda de actividade enzimática e elevado custo das enzimas. Na literatura têm sido relatados trabalhos de investigação a fim de superar estes problemas.

### 2.3.4 Temperatura

A temperatura influencia claramente o rendimento da reacção de transesterificação. Uma temperatura de reacção superior pode diminuir a viscosidade dos óleos e resultar num aumento da taxa de reacção e num tempo de reacção menor. Esta deve de ser inferior ao ponto de ebulição do álcool para garantir a ausência de perdas de álcool por vaporização e que ele esteja presente no meio reaccional.

Na catálise homogénea, quando a temperatura de reacção aumenta para além da gama óptima, o rendimento da produção de biodiesel diminui, porque temperatura elevada acelera a reacção de saponificação dos triglicerídeos. Dependendo do óleo utilizado, a gama de temperatura óptima varia entre 50 e 60°C.

Sabe-se que na catálise enzimática não é possível operar a temperaturas tão elevadas, devido à possível desactivação da enzima. Neste caso, é recomendado como gama óptima 30-50°C, dependendo da enzima utilizada. Nie *et al.* (2006) estudaram a influência da temperatura na reacção de transesterificação catalisada pela enzima imobilizada *Candida sp.* 99-125 (7000 U/g), com razão molar metanol:óleo de salada=3:1. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 2.12.



**Figura 2.12** Efeito da temperatura na metanólise. Os triângulos brancos representam o tempo reaccional de 60 h os outros referem-se ao tempo reaccional de 30 h (Nie *et al.*, 2006).

Da figura anterior pode observar-se que o rendimento mais elevado é alcançado a 40°C. Para temperaturas inferiores podem ser alcançados melhores resultados, se o tempo de reacção for estendido para 60 h. Para temperaturas de reacção superiores a 40°C, observa-se diminuição da conversão, devido à inactivação da enzima pelo calor.

### 2.3.5 Agitação

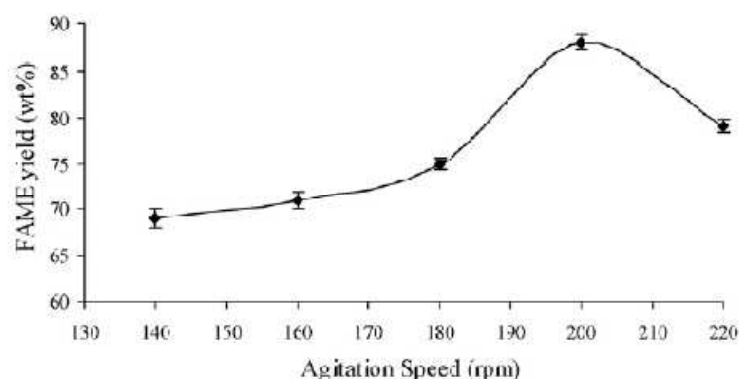
A agitação é imprescindível para promover o contacto dos reagentes intervenientes na reacção.

No caso dos catalisadores imobilizados, os reagentes têm de se difundir do meio líquido até à superfície externa da partícula e daí até aos poros internos do catalisador. As limitações devido à transferência de massa externa e à difusão interna, podem ser



minimizadas conduzindo a reacção a uma velocidade óptima de agitação (Sonare and Rathod, 2010).

Halim and Kamaruddin (2008), levaram a cabo um estudo em que testaram o efeito da velocidade de agitação na reacção de transesterificação do óleo de palma alimentar usado, sob as seguintes condições operatórias: razão molar metanol:óleo de 4:1, 4% da enzima Novozyme<sup>®</sup> 435 (com base na massa de óleo), 40°C e 12h de reacção. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 2.13.



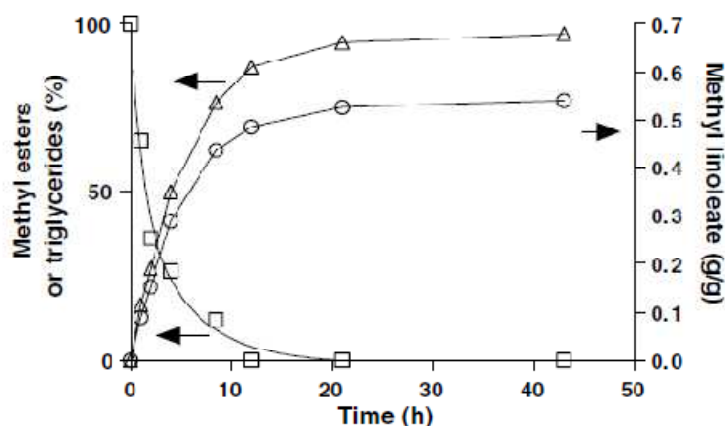
**Figura 2.13** Efeito da intensidade de agitação na reacção de transesterificação de óleo de palma alimentar usado com metanol (Halim and Kamaruddin, 2008).

Da figura anterior constata-se que com o aumento da velocidade de 140 para 200 rpm, o rendimento de FAME aumentou, sendo o maior rendimento obtido às 200 rpm. Contudo, quando a velocidade reaccional aumentou para 220 rpm, o rendimento de FAME diminuiu, possivelmente devido à inactivação da enzima, traduzindo-se na sua desintegração.

### 2.3.6 Tempo de reacção

A taxa de conversão de ésteres de ácidos gordos aumenta com o tempo de reacção, até o equilíbrio ser atingido, pois sendo uma reacção reversível, após este período a conversão em ésteres não sofre qualquer incremento. No início, a reacção é lenta devido à mistura e dispersão do álcool no óleo. Após um determinado período de tempo a reacção prossegue muito rapidamente. Normalmente, o rendimento atinge um máximo num tempo de reacção inferior a 90 min (no caso da catálise homogénea), permanecendo relativamente constante com um aumento adicional no tempo de reacção.

Por sua vez, a catálise enzimática necessita de bastante mais tempo, quando comparada com os 90 min necessários na catálise homogénea. Na Figura 2.14 está patente os resultados obtidos por Royon *et al.* (2007), na reacção de transesterificação do óleo de semente de algodão, onde as condições operatórias foram: razão molar metanol:óleo 6:1, 50°C, 12 mL de t-butanol, 18 g de óleo e 300 mg de enzima Novozyme® 435.



**Figura 2.14** Evolução a concentração de triglicerídeos (quadrados), ésteres metílicos (triângulos) e linoleato de metilo (círculos) do óleo de semente de algodão ao longo do tempo, num sistema descontínuo (Royon *et al.*, 2007).

Da figura anterior, é possível observar que aproximadamente após 10h de reacção o consumo de óleo está praticamente completo. Contudo, sabe-se que o tempo reaccional varia bastante de ensaio para ensaio, pois é um factor que está directamente relacionado com as condições operatórias do ensaio em causa.

Em suma, os tempos reaccionais necessários para se conseguir um determinado rendimento dependem de muitos factores experimentais: temperatura, concentração de reagentes, tipo de catalisador, etc.

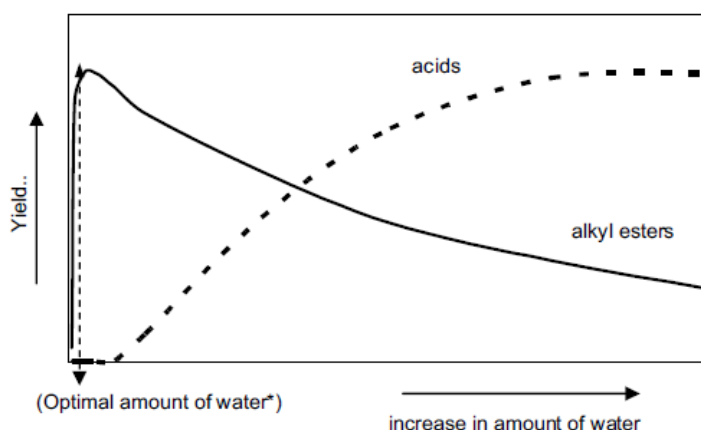
### 2.3.7 Teor de água

Como já foi referido anteriormente, é indesejável a presença de água no meio reaccional de transesterificação por catálise alcalina homogénea.

Na catálise enzimática, o conteúdo de água na mistura reaccional é um factor crucial que determina o rendimento da síntese do biodiesel, e depende do tipo de preparação da lipase e da composição da mistura reaccional. De acordo com Ognjanovic *et al.* (2009), as lipases necessitam de uma pequena quantidade óptima de água para manter a actividade nos meios orgânicos, que deverá ser determinada para cada sistema de

reação. Por exemplo, a lipase *C. antarctica* contém água suficiente para preservar a configuração catalítica.

Shah e Gupta (2007) determinaram o efeito do conteúdo de água na transesterificação do óleo de jatrofa com etanol catalisada pela lipase *Pseudomonas cepacia*, e constataram que um aumento na quantidade de água adicionada de 1-10% (m/m enzima) aumentou o rendimento da transesterificação. Na Figura 2.15 observa-se a influência do teor de água (água adicionada) no rendimento das reações concorrentes de transesterificação e hidrólise (que conduz à formação de ácidos).



**Figura 2.15** Efeito da concentração de água na mistura reaccional no rendimento dos produtos da transesterificação enzimática (ésteres alquílicos) e hidrólise (ácidos) (Antczak et al., 2009).

Shimada *et al.* (2002) investigaram a metanólise de óleos vegetais usados catalisada pela lipase *C. antartida* num sistema livre de solvente. Concluíram que a água gerada na síntese dos ésteres dos ácidos gordos livres, contidos nesses óleos, estava rodeada pelo glicerol, não prejudicando a transesterificação. Apesar disso, a concentração de ésteres metílicos aumentou gradualmente durante o processo.

## 2.4 Enzimas

A produção comercial de enzimas é uma indústria relativamente recente, tendo começado em grande escala no século XX. O termo “enzima” foi introduzido por Wiliam Kuhne para descrever os extractos dos organismos vivos. A palavra provem das palavras gregas “en”, que significa “em” e “zyme”, que significa “levedura” ou “fermento”.

No início as enzimas industriais foram extraídas de plantas e animais. O material vegetal ou músculo era picado e macerado num líquido apropriado e em seguida agitado para extrair as enzimas solúveis. O material sólido era então removido por filtração, ficando o líquido contendo a actividade enzimática. Embora este sistema funcionasse relativamente bem para a época, era trabalhoso e produzia diferentes quantidades de enzimas, sendo também difícil de controlar. Além disso, a crescente consciencialização da aplicabilidade das enzimas para diversos processos industriais aumentou a sua procura, e produzir o material enzimático necessário tornou-se difícil. Como resultado, a fermentação microbiana substituiu os extractos de animais e plantas como principal fonte das enzimas industriais. As fontes microbianas podem ser bactérias, fungos ou leveduras.

Como já referido na subsecção 2.3.3.3, as enzimas são um tipo de proteínas presentes, e essenciais, a todos os seres vivos, encontrando-se nos animais, plantas e microrganismos (fungos e bactérias). Actuam como catalisadores biológicos sem sofrer qualquer alteração permanente delas próprias. Não são consumidas na reacção e podem, portanto, continuar a catalisar a reacção enquanto os reagentes adequados estão disponíveis, normalmente chamados de substratos.

As lipases (acilhidrolase triacilglicerol, EC 3.1.1.3) fazem parte da família das hidrolases que actuam em ligações de ésteres carboxílicos. O papel fisiológico natural das lipases é a hidrólise dos triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos gordos e glicerol, mas também podem catalisar esterificações, alcoólises e transesterificações em meios não aquosos (Caballero *et al.*, 2009).

As características das enzimas como biocatalisadores são as seguintes: (1) são capazes de catalisar as reacções à temperatura e pressão ambiente numa gama de pH neutra e (2) a especificidade, estereoespecificidade e regioespecificidade do substrato é estrita bem como a especificidade da reacção. As suas preparações comerciais são derivadas principalmente de fontes microbianas devido ao seu baixo custo de produção e à fácil alteração das propriedades. Tanto as lipases extracelulares como as intracelulares são usadas na síntese de biodiesel, mas a maior parte das investigações são realizadas usando preparações comerciais (também imobilizadas) de lipases extracelulares, que foram imobilizadas em diferentes meios (Antczak *et al.*, 2009). Apenas algumas lipases são capazes de realizar a síntese de biodiesel eficazmente e só algumas delas podem catalisar a reacção em ambos os sistemas: com solvente orgânico e sem solvente (vide Tabela 2.4).

A recuperação de enzimas activas de misturas reaccionais é um outro problema quando são usadas enzimas livres (não imobilizadas). Assim, a sua imobilização, está a atrair a atenção mundial na aplicação prática de bioprocessos. Em geral, os biocatalisadores imobilizados são estáveis e de fácil manuseio em comparação com os seus homólogos livres. Um dos seus recursos mais importantes é que eles podem ser usados repetidamente a longo prazo (Aehle, 2004).

**Tabela 2.4** *Lipases microbianas utilizadas em estudos sobre a produção de biodiesel em sistemas contendo solvente orgânico ou não (Antczak et al., 2009).*

Sistema com solvente orgânico	Sistema sem solvente orgânico
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>Candida antarctica</i>	<i>Candida antarctica</i>
<i>Rhizopus delemar</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Mucor miehei</i>
<i>Mucor miehei</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
<i>Candida rugosa</i>	<i>Thermomyces lanuginosa</i>
	<i>Aspergillus niger</i>

A especificidade do substrato das lipases consiste na capacidade de distinguir características estruturais das cadeias acil, como: comprimento, número, posição, configuração de ligações duplas, presença de grupos ramificados e a natureza da fonte de acil (ácido livre, éster alquílico, éster de glicerol, etc).

A especificidade das lipases usadas na síntese de biodiesel baseia-se na sua regioespecificidade e especificidade em relação ao comprimento da cadeia de hidrocarbonetos do ácido gordo.

Em termos de regioespecificidade, isto é, a posição da ligação éster, as lipases foram divididas em três tipos:

- *sn*-1,3-específica (hidrolisa a ligação éster na posição  $R_1$  ou  $R_3$  dos triglicerídeos);
- *sn*-2-específica (hidrolisa a ligação éster na posição  $R_2$  dos triglicerídeos);

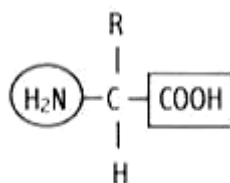
- inespecífica (não faz distinção nas posições das ligações éster a ser separadas).

Acredita-se que as lipases caracterizadas por uma estreita regioespecificidade, não são aplicáveis na produção de biodiesel. Portanto, as lipases usadas para este fim têm de possuir uma ampla especificidade e regioespecificidade ao substrato. São exemplo as lipases de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica* e *Candida cylindracea*. Contudo algumas lipases *sn*-1,3-específica, como as de *R. oryzae* e *Mucor miehei* catalisam eficientemente as reacções de transesterificação. A elevada produtividade das reacções de transesterificação enzimática resulta na migração de resíduos acil da posição *sn*-2 para a posição terminal no glicerol (*sn*-1 e *sn*-3) (Antczak *et al.*, 2009).

A regioespecificidade das lipases pode ser afectada por diversos factores (temperatura, pH, presença de água, etc.) e alguns deles ainda não foram descobertos.

#### 2.4.1 Estrutura das proteínas e das enzimas

As propriedades básicas das enzimas são determinadas pela natureza das proteínas, que são a sua constituição. Todas as proteínas são compostas por aminoácidos, por sua vez, cada aminoácido (Figura 2.16) é constituído por um grupo amino ( $\text{-NH}_2$ ) e um grupo ácido carboxílico ( $\text{COOH}$ ), ambos ligados ao mesmo átomo de carbono. As diferenças nos aminoácidos (existem cerca de 20 que ocorrem na natureza) são determinadas pelas variações no grupo “R”, por vezes chamado “cadeia lateral”. Esta, por sua vez, pode conter grupos ácidos ou grupos amino, bem como outros grupos funcionais.



**Figura 2.16** Fórmula geral do aminoácido (Mathewson, 1998).

Ainda que a maioria das enzimas envolvidas nas actividades metabólicas fundamentais das células tenham sido identificadas, muitos problemas permanecem sem solução, incluindo o controlo genético das sínteses enzimáticas, os mecanismos de regulação das actividades enzimáticas e o papel das formas múltiplas de certas enzimas no desenvolvimento e diferenciação. Ainda não está totalmente esclarecido em termos moleculares, de que maneira elas catalisam as reacções químicas com eficiência, precisão e especificidade tão elevada (Neto, 2002).

---

#### 2.4.2 Actividade catalítica das enzimas e factores que a afectam

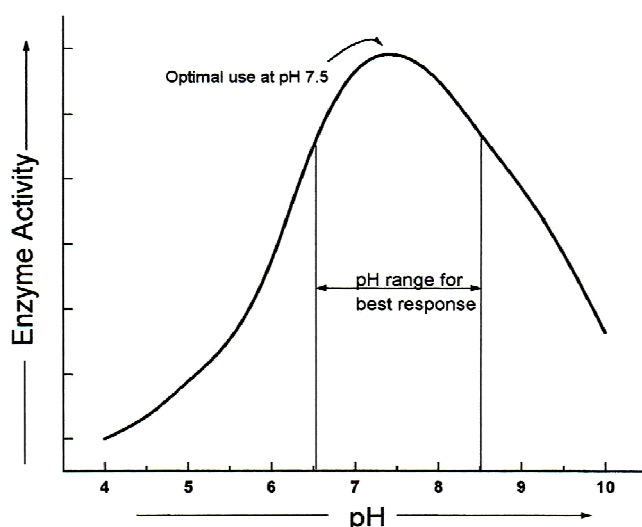
O desempenho das enzimas é avaliado através da sua actividade. Uma enzima é mais activa do que outra quando uma menor quantidade é necessária para atingir uma conversão específica. A medida de conversão por unidade de tempo é a quantidade de produto formado por unidade de tempo sob condições padronizadas bem definidas. A actividade enzimática descreve a produtividade da enzima sob condições padronizadas. Descreve quanto uma dada substância é convertida num determinado tempo e sob condições definidas no produto correspondente. A actividade catalítica, que é uma quantidade cinética, é dependente do tempo e das condições em que ocorre a reacção (Uhlig, 1998).

Nos primórdios, as unidades eram definidas pelo investigador que primeiramente descobrisse e caracterizasse a enzima. Contudo, na literatura mais antiga, a actividade enzimática era expressa em unidades arbitrárias, i.e., alterações na absorvância, quantidade de substrato convertido expresso em miligramas ou micromoles. Estes parâmetros eram relatados em várias unidades de tempo, tais como 1 min, 30 min, ou 1 h. Para obter valores padronizados para cada enzima, em 1961 a Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica definiu a Unidade Internacional U, como a actividade de uma enzima que, sob condições padronizadas optimizadas, catalisa a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto (*Enzymes in industry : production and applications*, 2004). A definição deve ser sempre apresentada de forma explícita, pois outras definições também têm sido utilizadas. A unidade do Sistema Internacional (SI) da quantidade de substância por unidade de tempo é 1 mol/s, e em 1972 a comissão IUPAC-IUB em nomenclatura bioquímica sugeriu o nome katal (símbolo kat) para a unidade SI de actividade enzimática (i. e. 1 kat = 1 mol/s). Este nome e símbolo não foram amplamente adoptados e dificilmente são empregues na literatura enzimológica. Um kat é equivalente a  $60 \times 10^6$  U (*Enzymology Labfax*, 1996).

A estrutura molecular das enzimas, que é essencial para a sua actividade catalítica está sujeita a ser destruída sob determinadas condições, tais como temperatura elevada, pH elevado ou baixo e presença de determinados solventes orgânicos, ou mesmo em condições favoráveis ao catalisador. A taxa a que cada reacção enzimática prossegue é dependente de vários factores, mas entre os mais importantes está o pH do meio reaccional, a temperatura, e a quantidade de substrato disponível para reagir face à quantidade de enzima presente.

#### 2.4.2.1 pH

Muitas enzimas têm uma gama bastante estreita onde podem catalisar eficientemente. O óptimo depende não só do pH como também pode ser influenciado pela temperatura e substrato. Para a maior parte das enzimas o pH óptimo pertence à gama de 5 a 8, contudo existem excepções (Aehle, 2004). Em geral, o pH ideal para as enzimas comerciais é próximo do neutro. A Figura 2.17 representa a actividade enzimática como função do pH. Para maior eficiência e menor custo, deve-se tentar usar sempre a enzima no seu pH óptimo. O pH óptimo real deve de ser determinado experimentalmente para cada enzima (Mathewson, 1998)



**Figura 2.17** Influência do pH na actividade de uma enzima comercial típica (Mathewson, 1998).

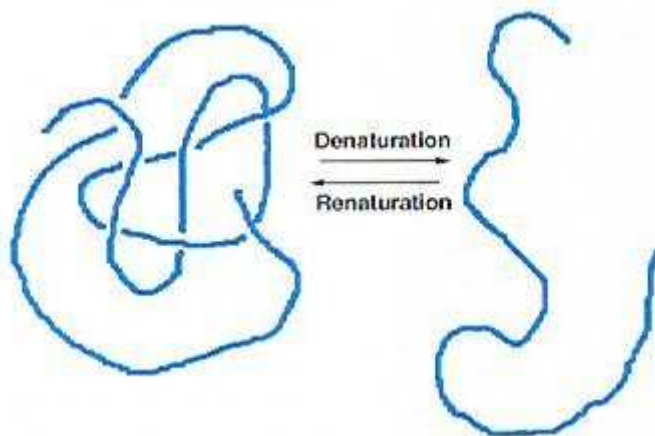
Se o pH é muito baixo ou acima do pH óptimo, as forças electrostáticas que suportam a cadeia de aminoácidos na sua própria estrutura, podem ser alteradas. A pH baixo, o grupo amino tende a ser positivamente carregado ( $\text{NH}_3^+$ ), enquanto o grupo ácido ( $\text{COOH}$ ) é neutro. As forças positivas repelem-se umas às outras, dissociando a energia dos componentes da enzima, o que resulta na alteração da estrutura terciária e secundária e, conseqüentemente alterações macroscópicas no sítio activo<sup>3</sup>. Em última análise, toda a cadeia da proteína (enzima) pode-se desdobrar (Figura 2.18). Quando isto acontece, diz-se que a enzima está desnaturada<sup>4</sup>, e normalmente, permanentemente

<sup>3</sup> Sítio activo – região na superfície da enzima onde ocorre a actividade catalítica.

<sup>4</sup> Desnaturação – perda dos arranjos espaciais normais numa cadeia polipeptídica.



inactivada. Por vezes, se o ambiente da enzima retorna a condições mais moderadas (pH menos extremo), a enzima pode redobrar à sua configuração normal e actividade. Se isto acontecer a enzima sofreu uma dobragem espontânea, chamada renaturação<sup>5</sup>. Como isto ocorre com um pequeno número de proteínas, não deve de ser considerado um evento provável nas enzimas comerciais (Mathewson, 1998).



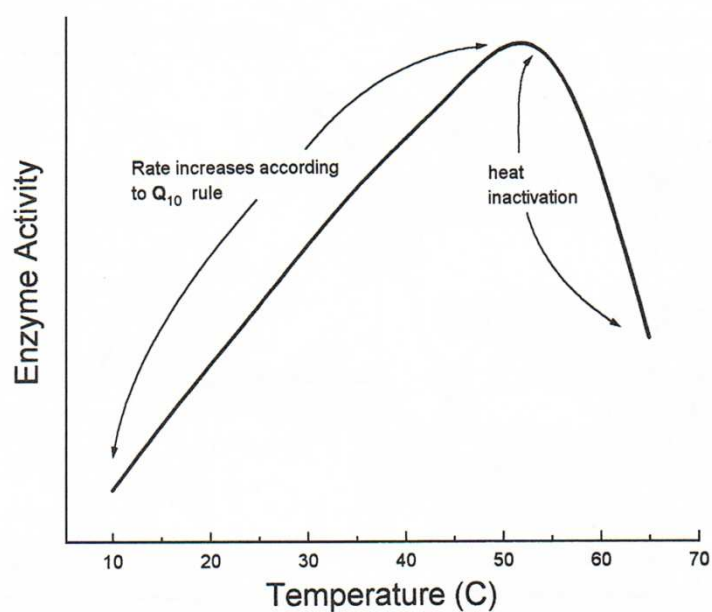
**Figura 2.18** Perda da estrutura tridimensional de uma proteína como resultado da desnaturação (Mathewson, 1998).

#### 2.4.2.2 Temperatura

O efeito da temperatura é semelhante ao efeito do pH, onde algum calor pode favorecer a enzima, mas demasiado pode inactivá-la permanentemente. Aumentar a temperatura do sistema ajuda a superar a barreira da energia, porque o aquecimento da solução faz com que as moléculas se movam mais rápido e deste modo os reagentes colidem com mais frequência e com maior eficiência energética. O aumento da temperatura está directamente relacionado com a desnaturação da enzima. Tal como no pH, existem excepções à regra. Para a maior parte das enzimas comerciais, a temperatura óptima varia entre 40 e 60°C. O perfil da actividade de uma enzima típica em função da temperatura está patente na Figura 2.19 (*Enzymes in industry : production and applications*, 2004).

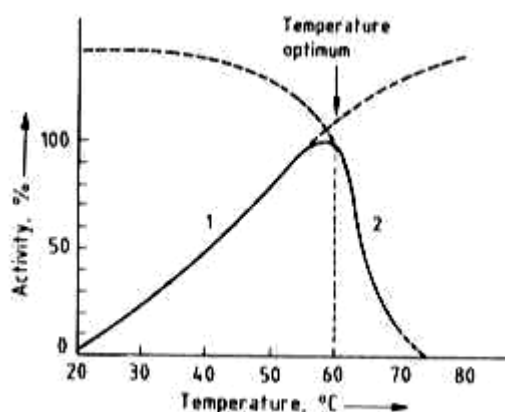
---

<sup>5</sup> Renaturação – restabelecimento dos arranjos espaciais normais numa cadeia polipeptídica.



**Figura 2.19** Influência da temperatura na actividade de uma enzima comercial típica (Mathewson, 1998).

A dependência da temperatura de reacções catalisadas por enzimas apresenta um óptimo, porque o aumento termodinâmico da taxa de reacção (curva 1 na Figura 2.20) é seguido por uma queda causada pela desnaturação térmica da enzima (curva 2 na Figura 2.20).

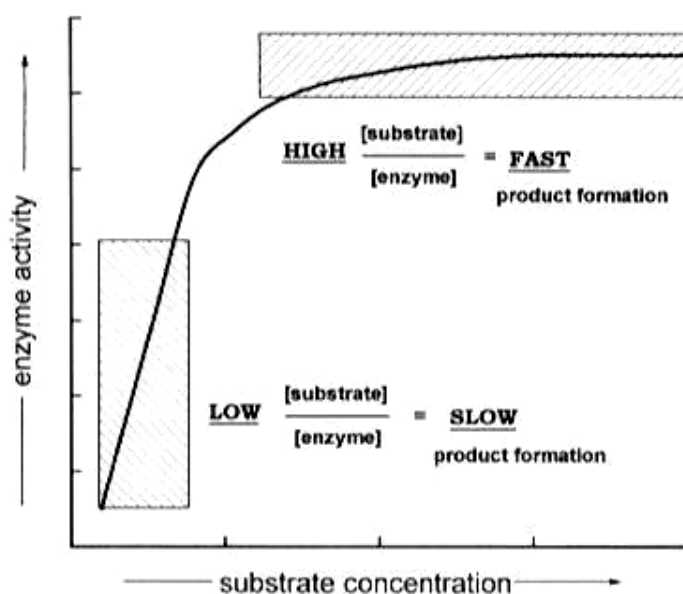


**Figura 2.20** Influência da temperatura na actividade enzimática e na taxa de reacção (Enzymes in industry : production and applications, 2004).

Em ambas as figuras anteriores confirma-se a gama de temperatura óptima (40-60 °C) em reacções catalisadas por enzimas.

### 2.4.2.3 Concentração do substrato

A enzima opera mais eficazmente quando está disponível um excesso de substrato, desde que este não lhe seja tóxico. Se a concentração do substrato é baixa comparada com a da enzima, as sucessivas colisões são em pequeno número. Por outro lado, quando a concentração do substrato é muito elevada comparada com a da enzima, as sucessivas colisões ocorrem muito rapidamente, garantindo que a maior parte da enzima está ligada a um complexo enzima-substrato, e assim os produtos são produzidos à taxa máxima. Na Figura 2.21, a curva mostra como a actividade da enzima responde à concentração do substrato.



**Figura 2.21** Efeito da concentração do substrato na actividade enzimática (Mathewson, 1998).

Em suma, a relação importante é a razão enzima/substrato. Quando esta é baixa (área à esquerda do gráfico), há pequena produção de produtos; quando é bastante elevada (área no topo do gráfico), a produção de produtos é bastante elevada e a actividade da enzima está no seu máximo (Mathewson, 1998).

### 2.4.2.4 Presença de água

A concentração de água num sistema de reacção enzimática, é um dos factores mais importantes que influencia a actividade da enzima. As enzimas necessitam de uma quantidade específica de água, ligada a elas para manter a actividade. A água afecta a acção das enzimas, influenciando a sua estrutura através de ligação não-covalente,

ruptura das pontes de hidrogénio ou facilitando a difusão do reagente, que influencia o equilíbrio da reacção (Knez, 2009).

#### 2.4.2.5 Glicerol

Segundo Royon *et al* (2007) a inibição devido à cobertura do catalisador com glicerol é inexistente no início da reacção e torna-se mais acentuada em elevadas conversões do óleo.

Resultados de estudos sobre o efeito do glicerol na eficiência da transesterificação indicam que ele inactiva as enzimas, particularmente em processos contínuos e em descontínuos sucessivos. O glicerol é hidrofílico e insolúvel no óleo, portanto é facilmente adsorvida na superfície da lipase imobilizada, o que conduz a um efeito negativo na sua actividade e na estabilidade operacional. A actividade das lipases imobilizadas em matrizes hidrofóbicas decresce consideravelmente quando expostas ao glicerol, pois as moléculas de glicerol adsorvem na superfície das matrizes, formando revestimento hidrofóbico o que torna as moléculas das enzimas inacessíveis aos substratos hidrofóbicos (Antczak *et al.*, 2009). A adição de outra substância hidrofóbica como a acetona ou a sílica gel, ao sistema de reacção, remove parcialmente o glicerol da lipase (através de adsorção da sílica gel), o que conduz à eficiente transesterificação. Du *et al.* (2003) observaram que a lavagem da enzima com álcool isopropílico restaura a sua actividade desde que o glicerol seja removido da matriz.

#### 2.4.3 Armazenamento

As condições óptimas para o armazenamento podem depender da enzima específica envolvida e da sua forma (líquido ou em pó), em geral, elas devem ser sempre armazenadas num ambiente seco e fresco.

O calor pode desnaturar a enzima sob uma variedade de condições. A enzima é provavelmente mais susceptível aos efeitos nocivos do calor quando está em solução com a água. Independentemente da maneira como é armazenada, a exposição repetida ao calor tem o potencial de a prejudicar e, por sua vez, o produto final.

Dependendo da forma física da enzima, isto é, líquida ou em pó, diversas práticas podem ajudar a preservar o nível original de actividade. A enzima deve de ser armazenada em recipientes à prova de humidade. No caso das enzimas em pó, o recipiente deve de ter uma barreira para a humidade incorporada na embalagem, para evitar que a humidade

---

ambiente migre através da embalagem para a enzima (*Enzymes in industry : production and applications*, 2004).

É preferível manter uma temperatura constante de armazenamento, a estar exposta a repetidas alterações da temperatura. Grandes flutuações na temperatura, e se acompanhadas por alterações de humidade podem ser muito prejudiciais à actividade da enzima.

#### Manutenção da actividade enzimática

É normal considerar que as enzimas estão “confortáveis” em condições que os humanos também estão mais confortáveis. Por exemplo, a água que é demasiado quente irá destabilizar a enzima e conduzir à perda de actividade. O mesmo acontece com o pH, que se for elevado (>8.0) ou baixo (<5.5) pode levar à desnaturação da enzima. O abuso físico, tal como forte agitação ou mistura, pode também conduzir à perda de actividade, bem como a combinação de qualquer um destes factores.

#### **2.4.4 Pré-tratamento e regeneração da enzima**

Ainda não está claro de que forma o pré-tratamento funciona, mas é provável que interfira nas enzimas imobilizadas, e possivelmente, aumente a transferência de massa na camada superficial ou altere a fase das intra-partículas e também resguarde a proximidade da enzima através da inibição dos álcoois e glicerol. Esta área precisa ser investigada a fim de elucidar a interacção entre a barreira, enzimas e óleo, mas o aparente impacto do pré-tratamento deve ser apoiado/confirmado devido às reutilizações múltiplas de enzimas para a produção industrial (Fjerbaek *et al.*, 2009).

Vários métodos de pré-tratamento para as lipases, livres e imobilizadas, têm sido investigados com vista a melhorar a sua actividade, estereoselectividade e estabilidade. Geralmente, os reagentes usados no pré-tratamento podem ser classificados, mas não limitados aos seguintes quatro tipos:

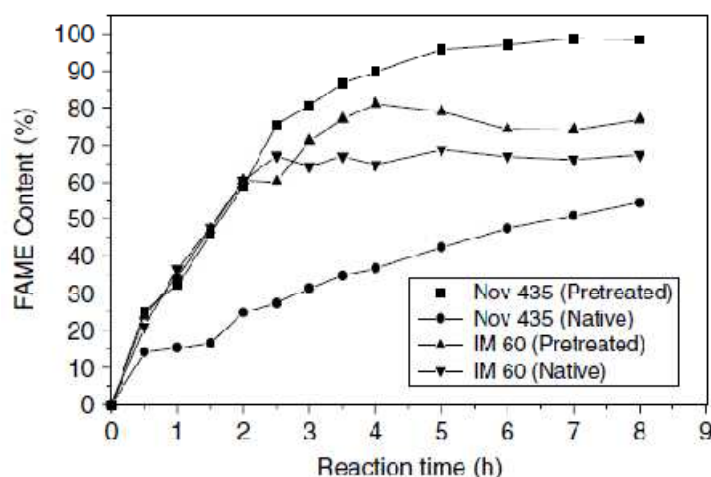
1. substratos ou seus análogos, que podem aumentar a actividade da enzima em solventes orgânicos envolvendo regularização do sítio activo da enzima por impressão molecular;
2. solventes orgânicos, que podem aumentar a actividade total de duas maneiras:
  - (i) eliminando outras proteínas das lipases,
  - (ii) causando uma mudança configuracional no sítio activo da “forma fechada” para a “forma aberta”;

3. sais, cuja incorporação com a proteína molecular poderia manter a configuração da lipase e evitar a grande mudança do pH óptimo;
4. enzimas lioprotectoras, cuja ligação com o sítio activo da lipase durante a fase de desidratação, poderá mantê-lo numa configuração cataliticamente activa.

Muitos processos de pré-tratamento são combinados com o objectivo de obter uma maior actividade e estabilidade da enzima (Lu *et al.*, 2010). Um exemplo, é a imersão de lipases em t-butanol e em outros álcoois com três ou mais carbonos, frequentemente usado para aumentar a actividade da lipase na síntese de ésteres metílicos (Royon *et al.*, 2007).

Acredita-se que o pré-tratamento em solvente orgânico resulta numa mudança de configuração da enzima e alteração na camada de hidratação em seu redor. Durante o pré-tratamento, a camada de hidratação ao redor da enzima é saturada pelo solvente orgânico, deixando a camada de hidratação mais hidrofóbica, o que facilita o transporte das moléculas hidrofóbicas de lípidos para o sítio activo da lipase.

A Figura 2.22 mostra o efeito da lipase pré-tratada durante a metanólise do óleo de farelo de arroz refinado, onde se pode verificar que no caso da enzima IM 60 o pré-tratamento apenas resultou num ligeiro aumento da sua actividade. O pré-tratamento consistiu em suspender 0,5g de lipase imobilizada em 5cm<sup>3</sup> de tert-butanol à temperatura ambiente. Após 1h o solvente foi removido e a lipase incubada em 10g óleo num frasco roscado, por mais 1h a 50°C e 150rpm. Contudo, no caso da Novozyme<sup>®</sup> 435 o aumento da actividade foi bastante significativo. Para o tempo de reacção de 7h, o teor de FAME alcançado no caso da enzima pré-tratada foi de 98%, sendo de 48% quando a enzima não sofrer qualquer tipo de tratamento prévio.



**Figura 2.22** Efeito do pré-tratamento das lipases (Novozyme® 435 e IM 60) no teor em FAME, durante a metanólise de óleo de farelo de arroz refinado (Lai et al., 2005).

Na literatura existem diversos métodos de pré-tratamento de enzimas. Por exemplo, Lai et al. (2005) suspendem 0,5g de enzima imobilizada em 5mL de t-butanol à temperatura ambiente. Após 1h remove o solvente e a lipase é incubada em 10g de matéria-prima (óleo) num frasco roscado a 50°C por mais uma hora com agitação de 150 rpm.

Os principais componentes da mistura reaccional são apolares (óleo/biodiesel), portanto o uso de um solvente apolar para lavar a lipase imobilizada ajuda a remover a camada de substrato/produto da superfície da enzima, preservando a sua actividade (R. C. Rodrigues et al., 2008).

De acordo com Ognjanovic et al. (2009), para melhorar o desempenho da lipase imobilizada, em meios com elevada polaridade, como os constituídos por metanol, procede-se à regeneração do biocatalisador lavando as suas partículas sólidas com álcoois que possuem 3 a 5 cadeias de carbono.

Na regeneração da enzima, Lai et al. (2005) lavaram a lipase Novozyme® 435 (0,5g) três vezes com 2mL de n-hexano e depois secaram-a através de ventilação de ar seco a 50°C, ou, em alternativa lavam-na duas vezes com 5mL de hexano, pré-incubam-na em t-butanol durante 1h, reutilizando-a no ensaio seguinte.

O pré-tratamento e a regeneração parecem ser aspectos importantes para alcançar maiores rendimentos na produção enzimática de biodiesel. No entanto, o efeito dos tratamentos e como estes devem ser utilizados com eficiência, em operações de grande escala ainda necessitam de ser determinados.

## **2.5 Conclusão**

Do exposto ao longo deste capítulo é possível apurar que o processo de produção de biodiesel já remonta há várias décadas. Constata-se que independentemente do tipo de catalisador é possível obter elevadas conversões dos triglicerídeos em ésteres sendo para tal necessário adaptar as condições operatórias ao tipo de catalisador em causa. Certo é que cada família de catalisadores apresenta as suas vantagens e desvantagens.

Actualmente, a nível industrial a produção de biodiesel é levada a cabo através do uso de catalisadores homogéneos alcalinos, pois alcançam elevadas conversões num curto período de tempo. Por outro lado, não são recuperáveis e geram resíduos de difícil gestão, necessitando o produto final de etapas de purificação mas complexas. Além disso, quando a matéria-prima são os OAU que possuem elevado teor de ácidos gordos livres, e se utilizem catalisadores homogéneos alcalinos propicia à diminuição do rendimento da reacção. Quando tal acontece é preferível o uso de catalisadores heterogéneos ou enzimáticos, visto que estes conseguem esterificar os ácidos gordos livres.

A tabela que se segue compara diversas variáveis na produção de biodiesel por via homogénea (alcalina e ácida) e enzimática.



**Tabela 2.5** Comparação de algumas variáveis em diferentes métodos de produção de biodiesel por transesterificação (Adaptado de Helwani et al., 2009 e Al-Zuhair, 2007).

Variável	Catálise		
	Homogénea		Enzimática
	Alcalina	Ácida	
Temperatura de reacção [°C]	60-70	55-80	30-40
Ácidos gordos livres	Produtos saponificados	Ésteres	Ésteres
Presença de água	Indesejável	Indesejável	Desejável dentro de certos limites
Rendimento em ésteres	Normal	Normal	Elevado
Recuperação do glicerol	Difícil	Difícil	Fácil
Purificação dos ésteres	Lavagens sucessivas	Lavagens sucessivas	Não é necessário
Custo do catalisador	Barato	Barato	Dispendioso

Os catalisadores heterogéneos e enzimáticos continuam a ser alvo de constante investigação, de modo a torná-los competitivos com os catalisadores homogéneos. As grandes desvantagens destes tipos de catálise dizem respeito ao custo do catalisador e o tempo de reacção necessário.

A aplicação industrial das enzimas depende da optimização de diversas condições, nomeadamente do tipo de solvente usado, temperatura, pH, entre outros.

O metanol, principal álcool usado na reacção de transesterificação, é tóxico para a enzima. Por esse motivo, existem diversos métodos que permitem contornar o problema, nomeadamente: adição de metanol por estágios e uso de solvente orgânico. A principal razão da adição de solventes orgânicos à mistura óleo-álcool consiste em melhorar mutuamente a solubilidade destes substratos e aumentar a estabilidade operacional da lipase. A necessidade de recuperação do solvente pode ser um inconveniente para o processo. Contudo, a concentração de solvente necessária para a conversão óptima não é elevada e consequentemente a energia requerida para a sua recuperação é aceitável; a recuperação de solventes é uma prática comum na indústria química aquando da produção de biodiesel por catálise homogénea e em todos os casos é necessário recolher o metanol em excesso.

Para responder às necessidades de desenvolvimento de estudos na área dos catalisadores enzimáticos, o presente trabalho torna-se fundamental na medida em que a matéria-prima estudada é a mesma, pretendendo-se averiguar a perda de actividade da

### **3 Procedimentos e planeamento experimentais**

#### **3.1 Introdução**

Existe muita informação publicada na área da produção de biodiesel, contudo quando a matéria-prima usada é o OAU essa informação não é tão vasta. No que concerne à perda de actividade do biocatalisador, na catálise enzimática a escassez de informação é ainda mais notória. Deste modo, é fundamental efectuar um estudo que incida sobre a mesma amostra e se conheçam e controlem os parâmetros operacionais, de modo a quantificar a perda de actividade da enzima.

Com base na pesquisa bibliográfica apresentada no Capítulo 2, foi seleccionado o álcool e o catalisador a usar na reacção de transesterificação de uma amostra de OAU, proveniente de uma das cantinas da Universidade de Aveiro. O planeamento experimental dos ensaios a efectuar, fundamentou-se nos resultados publicados e no trabalho desenvolvido por Amorim (2009), em relação aos quais se atingiram maiores rendimentos da reacção.

Na secção 3.2 deste capítulo são apresentados os diversos ensaios a realizar, assim como os parâmetros de caracterização do OAU e do biodiesel. Na secção 3.3 apresenta-se o material e os métodos necessários ao estudo da perda de actividade da enzima. Finalmente, são apresentadas algumas conclusões na secção 3.4.

### 3.2 Ensaios a realizar

No presente trabalho não se efectuaram ensaios com vista à optimização das condições operatórias. Estas foram seleccionadas com base em estudos já desenvolvidos por outros autores, que se encontram na bibliografia consultada, onde foram obtidos maiores rendimentos (vide Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** *Resumo das condições experimentais na transesterificação por catálise enzimática praticadas por outros autores*

Catalisador	Matéria-prima	Temperatura [°C]	Tempo reaccional [h]	Razão mássica catalisador:óleo [%]	Razão molar metanol:OAU	Razão volúmica solvente:óleo	Agitação [rpm]	Solvente	Césteres [%]	Referência
Novozyme 435 (10.000 PLU/g)	OAU	50	8	10	1:1	-	150	-	51	(Maceiras <i>et al.</i> , 2009)
	OAU	50	4	10	25:1	-	150	-	89,1	
Novozyme 435	Óleo de palma alimentar usado	40	12	4	4:1	-	200	t-butanol	88	(Halim <i>et al.</i> , 2008)
Novozyme 435	Óleo de colza refinado	35	24	2	4:1	1:1	130	t-butanol	90	(Li <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rhizopus oryzae</i> (150.000 U/g)	OAU	40	30	30	4:1	-	220	-	88-90	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
Novozyme 435	OAU	40	48	10	4:1	0,75	200	t-butanol	83	(Amorim, 2009)

\* PLU = Propyl Laurate Units (unidades de propil laurato)

Assim, a amostra de OAU teve como proveniência o óleo de amendoim, usado numa das cantinas da UA. Seleccionou-se o metanol, por ser o mais reactivo, e a Novozyme® 435 por apresentar melhores rendimentos na transesterificação. Com o objectivo de contornar/minimizar os problemas de toxicidade do álcool para com a enzima, foram adoptados dois métodos: (i) uso de solvente orgânico hidrofílico e (ii) adição de metanol de uma forma faseada/por estágios. Na Tabela 3.2 estão resumidas as condições operatórias usadas em ambos os métodos implementados.

**Tabela 3.2** Condições operatórias usadas nos ensaios com uso de solvente e adição de metanol por estágios.

	Método	
	Uso de solvente	Metanol por estágios
$m_{\text{Novozyme}^{\text{®}} 435}$ [g]	15	15
$m_{\text{OAU}}$ [g]	150	150
$V_{\text{metanol}}$ [mL]	27,2	27, 2 (adicionado em quatro porções de 6,8 cada)
$V_{\text{t-butanol}}$ [mL]	120	–
razão mássica catalisador:OAU [%]	10	10
razão molar álcool:OAU	4:1	4:1
razão volumétrica de solvente	0,75	–
temperatura [°C]	40	40
agitação orbital [rpm]	200	200
tempo de reacção [h]	48	48

O objectivo do presente trabalho concerne em estudar a perda de actividade da enzima Novozyme<sup>®</sup> 435 após ser empregue em reacções de transesterificação sucessivas na presença de solvente ou adição de metanol por estágios. A perda de actividade da enzima será avaliada através da diminuição do rendimento em ésteres.

Todos os ensaios foram realizados em reactor fechado, descontínuo, de modo a minimizar perdas de componentes voláteis da mistura reaccional, nos momentos de recolha de amostra, bem como ao longo de todo o ensaio. Sendo o metanol bastante reactivo, foi necessária uma menor razão molar álcool:OAU e menor tempo de reacção, em relação ao etanol. Factores que se reflectem no menor consumo energético necessário à manutenção da temperatura e agitação.

Quanto ao solvente, o que apresentou melhores resultados no estudo de Amorim (2009) foi o tert-butanol, razão pela qual foi seleccionado no presente trabalho.

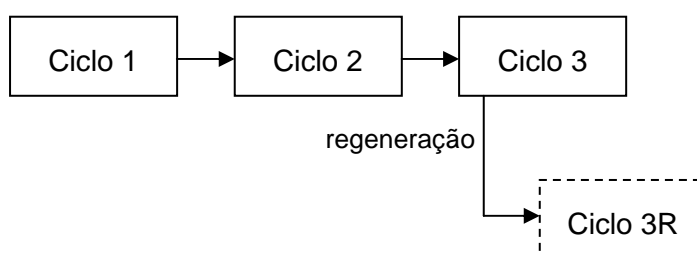
O catalisador enzimático seleccionado para avaliar a perda de actividade foi a enzima comercial Novozyme<sup>®</sup> 435 com actividade de 10.000 U/g, visto ter sido a que apresentou

melhores resultados no estudo realizado por Amorim (2009). A enzima foi gentilmente cedida pela Novozymes France S.A.

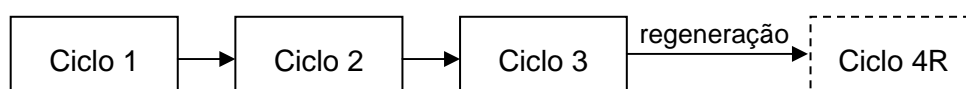
Antes de se dar início aos ensaios apresentados neste trabalho, realizaram-se outros em que se reutilizou amostras de enzima (Novozyme<sup>®</sup> 435). Estes ensaios decorreram nas mesmas condições operatórias do presente estudo e consistiram na análise qualitativa do comportamento de diversos solventes (e.g. n-hexano, tert-butanol e álcool isopropílico) usados na lavagem/regeneração da enzima. Com isto, e tendo por base o relatado por Chen *et al.*, (2003), pretendia-se observar *in situ* qual o “melhor” solvente que no ensaio subsequente originava melhor e maior separação de fases.

Finalmente, para cada um dos métodos implementados neste trabalho, realizaram-se 3 ciclos com uso de solvente (tert-butanol) e 4 ciclos com adição de metanol por estágios, cuja sequência/articulação se esquematiza de seguida.

- Uso de solvente



- Adição de metanol por estágios



As enzimas utilizadas nos Ciclos 3 e 3R dos ensaios com uso de solvente, provieram do Ciclo 2 sendo subdivididas equitativamente em dois frascos, para se verificar a influência da lavagem/regeneração (retângulos a tracejado) na actividade enzimática. Ambos os ciclos foram realizados em paralelo. No caso do Ciclo 4 na adição de metanol por estágios optou-se por lavar/regenerar a totalidade da enzima pois, após concluído o Ciclo 3 esta encontrava-se completamente aglomerada pela glicerina. O procedimento de regeneração da enzima consiste na sua lavagem com álcool isopropílico.

Note-se que a enzima virgem usada em ambos os métodos foi pré-tratada, adaptando o descrito por Chen *et al* (2003), que consiste em:

- a. Suspende a enzima em t-butanol à temperatura ambiente durante 1 h;

- b. Remover o solvente e incubar a enzima no OAU num frasco roscado durante 1 h a 40°C e 200 rpm.

As amostras de mistura reaccional recolhidas ao longo do tempo foram extraídas do reactor com o auxílio de uma seringa e colocadas num pequeno gobelé, do qual se pipetou 30 µL para o vial de armazenamento. O remanescente foi recolhido novamente com a seringa e reposto no reactor.

Entre cada ciclo procedeu-se à retirada da mistura reaccional para uma ampola de decantação, mantendo-se a enzima dentro do reactor para o ciclo seguinte. A mistura reaccional permaneceu a decantar na ampola, até completa separação das fases. Posteriormente, separou-se a fase mais densa (glicerina) e extraiu-se da fase menos densa (biodiesel) o metanol e/ou solvente, recorrendo-se ao evaporador rotativo (sob pressão). O biodiesel foi levado à estufa para o desidratar. Por fim, foi armazenado em frascos escuros para posteriormente ser caracterizado.

No final de cada ciclo, procedeu-se à recuperação do solvente e/ou metanol da fase rica em ésteres, recorrendo-se ao evaporador rotativo (sob pressão). De seguida, o biodiesel obtido foi seco em estufa para posterior caracterização segundo alguns parâmetros (e.g. teor em ésteres, densidade, viscosidade). Em alguns ensaios após separação das fases recorreu-se à centrífuga com o intuito conseguir extrair mais glicerina, mas sempre sem sucesso. Contudo, é de notar que não é objectivo do presente trabalho a etapa de purificação do biodiesel, por isso, a metodologia adoptada foi muito simples e a mesma em todos os ciclos, em ambos os métodos.

### **3.3 Material e métodos**

Tal como já foi referido anteriormente, o OAU utilizado na realização deste estudo foi oriundo do Refeitório de Santiago da Universidade de Aveiro, sendo o óleo vegetal que lhe deu origem, maioritariamente de amendoim. Recolheu-se e armazenou-se uma amostra com cerca de 20 litros.

Primeiramente, a componente laboratorial deste trabalho iniciou-se pela caracterização desta amostra de OAU, a ser utilizada em todos os ensaios.

Os respectivos procedimentos experimentais, bem como os necessários à caracterização do biodiesel produzido encontram-se descritos na secção 3.3.1.

As sub-amostras necessárias a cada ensaio foram sendo recolhidas da amostra armazenada, sendo que todas elas sofreram o mesmo pré-tratamento, como referido na secção 3.3.2.

Os diversos produtos químicos utilizados no presente trabalho foram: hidróxido de sódio em pastilhas (Pronalab, 48), metanol (Sigma-Aldrich, 32213), tert-butanol (Panreac, 131903.1611), álcool isopropílico (José M. Vaz Pereira, S. A., 10904), piridina (Panreac, 131457.1611), clotrimetilsilano (Acros Organics, 426431000), N,O-Bis(trimetilsilano) (Panreac, 355588.1905), metil heptadecanoato (Fluka, 51633) éter de petróleo (Merck, 1775), acetona (destilada) e fenolftaleína (Riedel-de-Haen, 33518).

Os dados de segurança dos vários produtos químicos e da enzima Novozyme<sup>®</sup> 435 são apresentados no Anexo A.

O destino dado aos resíduos gerados neste trabalho encontra-se sumariado no Anexo B.

### **3.3.1 Caracterização do OAU e do biodiesel**

O OAU foi deixado a decantar e usou-se sempre a camada superficial (homogeneizada); não sendo necessário filtrá-lo. Posteriormente, procedeu-se à caracterização da amostra de OAU através da determinação dos seguintes parâmetros: viscosidade, densidade, teor de humidade, valor ácido e massa molar. Diversos parâmetros também foram determinados em relação ao produto final.

#### **3.3.1.1 Densidade**

A densidade é a relação entre a massa de uma substância e o volume que esta ocupa, a uma determinada temperatura.

Em relação ao OAU é um parâmetro importante de determinar, devido à necessidade deste valor para cálculo do valor ácido.

Tal como no OAU, no biodiesel também é necessário saber a sua densidade para posteriormente calcular o valor ácido.

É necessário determinar a densidade do biodiesel para posterior comparação como os valores limites (mínimo e máximo) impostos pela norma EN ISO 14214:2003<sup>6</sup>. Este parâmetro desempenha um papel importante na eficiência de atomização do combustível.

---

<sup>6</sup> Norma Europeia onde estão estipulados valores de diferentes propriedades que um biodiesel comercial deve cumprir.

---



A densidade do OAU e do biodiesel foi determinada usando um densímetro “Precision”, sem termómetro acoplado, com um comprimento de 280 mm, sendo a gama de medida compreendida entre 0,700 g/cm<sup>3</sup> e 1,000 g/cm<sup>3</sup> e graduação de 0,005 g/cm<sup>3</sup>.

O procedimento efectuado (adoptado da norma ISO 3675:1998) foi o seguinte:

- a. Transferir uma porção de amostra para um cilindro (por exemplo uma proveta de 100 mL ou 250 mL) sem grande agitação, para evitar a formação de bolhas de ar;
- b. Colocar a proveta com a amostra numa posição vertical, num local sem correntes de ar e onde a temperatura não varie mais do que 2°C durante o ensaio;
- c. Agitar a amostra com um termómetro para homogeneizar a mistura. Registrar a temperatura e remover o termómetro;
- d. Introduzir o densímetro sem tocar nas paredes do cilindro;
- e. Deixar o densímetro atingir o equilíbrio. Mergulhar o densímetro 1 ou 2 milímetros e deixar alcançar de novo o equilíbrio;
- f. Ler e registar o valor lido na escala do densímetro;
- g. Retirar o densímetro e agitar novamente a amostra com o termómetro, para verificar se houve variação da temperatura entre o início e o fim do ensaio;
- h. Lavar o densímetro e o termómetro com éter de petróleo e posteriormente com acetona;
- i. Efectuar mais duas medições;
- j. Corrigir o valor da densidade para 15°C.

Como o densímetro usado nas determinações estava calibrado a 20°C, a correcção da temperatura faz-se através da seguinte equação (ISO 3675:1998(E)):

$$\rho_{15^{\circ}\text{C}} = \frac{\rho_{T(^{\circ}\text{C})}}{1 - 23 \times 10^{-6}(T - 15) - 2 \times 10^{-8}(T - 15)^2} \quad (3.1)$$

Onde  $\rho_T$  representa a densidade e  $T$  a temperatura (em °C) à qual foi efectuada a medição.

### 3.3.1.2 Viscosidade

A viscosidade cinemática caracteriza-se pela resistência de escoamento de um fluído, sob a acção da gravidade. É uma propriedade ainda mais importante que a densidade,

na atomização e distribuição do combustível, daí a relevância da sua determinação no biodiesel.

Para determinar a redução da viscosidade conseguida nos ensaios realizados, procedeu-se à determinação deste parâmetro para a amostra de OAU e para as amostras de biodiesel.

Mede-se por meio de viscosímetros, aparelhos em que geralmente se determina o tempo que um certo volume de líquido leva a escoar-se através de um orifício de pequeno diâmetro.

Utilizou-se um viscosímetro “Cannon-Fenske” para fluidos transparentes com comprimento total de 250 mm. Uma vez que o OUA e o biodiesel apresentam valores de viscosidade bastante distintos, recorreu-se ao uso de dois viscosímetros com gamas de aplicação diferentes:

- OAU → 20 – 100 mm<sup>2</sup>/s ± 0,35% e c = 0,10446 (@40°C);
- biodiesel → 1,6 – 6,4 mm<sup>2</sup>/s ± 0,35% e c = 0,010505 (@40°C);

Ambos os viscosímetros mencionados anteriormente satisfazem os requisitos das normas ASTM D445, ASTM D446, IP 71, ISO 3104 e ISO 3105.

Em ambas as determinações o procedimento desenvolvido foi o seguinte (baseado na norma ISO 3104):

- a. Ajustar e manter a temperatura do banho termoestático para 40°C;
- b. Lavar o viscosímetro várias vezes com éter de petróleo, sendo a última lavagem com acetona;
- c. Secar o viscosímetro, fazendo passar uma corrente de ar quente durante cerca de 2 minutos;
- d. Encher o bolbo do viscosímetro e esperar que este atinja a temperatura do banho (aproximadamente 30 minutos);
- e. Com o auxílio de uma pompete elevar o fluido acima da 1ª marca (superior);
- f. Retirar o pompete e deixar que o fluido flua livremente. Cronometrar o tempo do escoamento, i. e., o tempo que decorre desde o instante em que fluido passa a 1ª marca até ao instante em que este atinge a 2ª marca (inferior);
- g. Registar o tempo decorrido
- h. Repetir o ensaio por mais duas vezes.

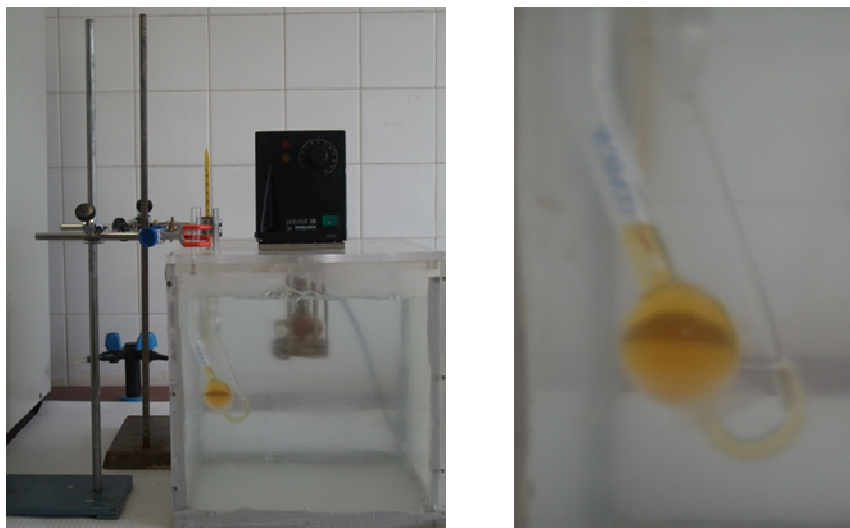
A viscosidade cinemática (mm<sup>2</sup>/s) é calculada através da seguinte equação:

---

$$v = c \times t \quad (3.2)$$

Sendo  $c$  a constante do viscosímetro ( $\text{mm}^2/\text{s}^2$ ) e  $t$  o tempo de escoamento (s).

Na Figura 3.1 está patente a montagem experimental utilizada na determinação da viscosidade.



**Figura 3.1** Fotografias da montagem experimental usada na determinação da viscosidade.

### 3.3.1.3 Teor de humidade

O teor de humidade é importante conhecer quer no OAU como do biodiesel, porque:

- quando a reacção de transesterificação decorre na presença de um catalisador alcalino (e. g. NaOH ou KOH), a presença de água promove uma reacção concorrente, a saponificação (vide secção 2.3.3.1);
- a presença de água no biodiesel pode causar corrosão dos motores. Por este motivo, é necessário determina-lo, sendo um requisito que consta na lista de parâmetros de caracterização obrigatória da Norma Europeia 14214.

Neste estudo, o teor de humidade foi apenas determinado para o OUA, com a intenção de avaliar a necessidade de o desidratar ou não, antes da reacção de transesterificação.

Este parâmetro foi determinado por coulometria através do método de titulação de Karl Fischer segundo a norma ISO 12937:2003. O coulómetro usado foi o 831 Karl Fischer coulometer da Metrohm.

Uma toma de massa conhecida de óleo é injectada na célula de reacção do coulómetro, na qual o iodo é gerado no ânodo para a reacção de Karl Fischer. Quando toda a água for titulada, o excesso de iodo é detectado pelo aparelho e a titulação termina. A quantidade de água é determinada com base na estequiometria de reacção: uma mole de iodo reage com uma mole de água, sendo a quantidade de água proporcional à corrente total integrada de acordo com a Lei de Faraday. Todo este processo é feito automaticamente pelo aparelho, à excepção da introdução da massa de amostra. Assim sendo:

- a. Ligar o aparelho e deixar condicionar, ligando também a agitação da célula de reacção;
- b. Recolher uma toma de 1 mL de OAU;
- c. Limpar a seringa e a agulha e pesar a seringa;
- d. Carregar na tecla START do aparelho e injectar a amostra;
- e. Pesar a seringa vazia;
- f. Registrar o valor do aparelho de Karl Fischer.

O aparelho devolve o valor de água na toma de ensaio injectada na célula de reacção. A fracção mássica de água, expressa em percentagem, ou seja, a percentagem de água no OAU, é obtida utilizando a equação seguinte:

$$W = \frac{m_2}{m_1 \times 10^4} \quad (3.3)$$

Onde  $m_1$  é a massa da toma em g e  $m_2$  a massa de água indicada pelo titulador em  $\mu\text{g}$ .

#### 3.3.1.4 Valor de iodo

O valor de iodo ou índice de iodo permite a determinação do grau de (in)saturação do biodiesel. Esta propriedade influencia a oxidação do combustível e o tipo de produtos de envelhecimento e depósitos formados em injectores de motores diesel. Portanto, este parâmetro é calculado apenas para o biodiesel, e consiste na análise do número de ligações duplas e triplas existentes na mistura, decorrentes dos ácidos gordos do combustível.

O índice de iodo pode ser determinado experimentalmente pelo método de Hanus (vide NP 941:1985), ou em alternativa pode ser calculado a partir do conhecimento da abundância dos diversos ésteres que compõem a amostra, como se descreve em seguida.

Este parâmetro pode ser determinado através do conhecimento do perfil em ésteres obtido por cromatografia gasosa, CG, pois permite a determinação da composição em massa dos ésteres metílicos. O índice de iodo da amostra obtém-se multiplicando a percentagem por um factor  $f_i$  (relativo a cada éster, vide Tabela 3.3).

Este é calculado pela seguinte equação:

$$\text{Valor de iodo} = \sum f_i \times \text{percentagem (m/m) do componente } i \quad (3.4)$$

**Tabela 3.3** Factores  $f_i$  de alguns ésteres metílicos (EN ISO 14214:2003, Anexo B).

Ésteres metílicos	Factor $f_i$
Ésteres saturados(Cxx:0)	0,000
Metil palmoleato (C16:1)	0,950
Metil oleato (C18:1)	0,860
Metil lineoleato (C 18:2)	1,732
Metil linoleato (C18:3)	2,616
Metil eicosenoato (C 20:1)	0,785

### 3.3.1.5 Valor ácido

O valor ácido corresponde à percentagem de ácidos gordos livres presentes numa amostra. O seu valor é dado pela massa de hidróxido de potássio necessária para neutralizar os ácidos gordos livres, contidos em uma grama de amostra e é determinado através de um método titrimétrico.

O objectivo da determinação do valor ácido do biodiesel reside na comparação com o valor máximo da norma EN ISO 14214:2003.

Quanto à determinação do parâmetro em causa, adoptou-se o procedimento que em seguida se descreve:

- Dissolver 1 mL de OAU (ou biodiesel) em 10 mL de álcool isopropílico, aquecendo ligeiramente;
- Titular com solução aquosa de NaOH 0,1% (m/m), usando fenolftaleína como indicador, até a cor carmim permanecer durante pelo menos 15 segundos;

c. Registar o volume de titulante gasto.

Através da fórmula que se segue determina-se o valor ácido:

$$\text{Valor ácido} \left[ \frac{\text{mg KOH}}{\text{g amostra}} \right] = \frac{V_{\text{NaOH gasto}} [\text{mL}] \times C_{\text{NaOH}} [\%]}{\rho_{\text{amostra}} [\text{g/L}]} \times 1,4 \times 10^6 \quad (3.5)$$

Note-se que a amostra pode ser o OAU ou o biodiesel.

### 3.3.1.6 Massa molar

O OAU é constituído essencialmente por mono, di e triglicerídeos e ácidos gordos. No presente trabalho considera-se que todos os glicerídeos se encontram sob a forma de triglicerídeos.

Para determinar a massa molar do OAU procedeu-se a uma reacção de transesterificação por catálise homogénea alcalina (razão mássica NaOH:OAU=0,8%, razão molar metanol:OAU=7:1 e T=60 °C) e posterior purificação do biodiesel (separação da glicerina, lavagem e secagem do biodiesel), bem como a sua caracterização por CG, de forma a identificar e quantificar os ésteres formados.

Uma vez identificados os ésteres presentes no biodiesel e a respectiva fracção mássica, procedeu-se à determinação da sua fórmula empírica média. Assim, calculou-se a fracção mássica dos elementos  $j$ , correspondentes a C (carbono), H (hidrogénio) e O (oxigénio) através da seguinte expressão:

$$w_{j,bs} \left[ \frac{\text{kg elemento } j}{\text{kg OAU}} \right] = \frac{\sum (w_{i,bs} \times w_{ji})}{\sum w_{i,bs}} \quad (3.6)$$

Onde  $w_{i,bs}$  representa a fracção mássica (em base seca – bs) de cada um dos ésteres detectados por CG e  $w_{ji}$  representa a fracção mássica do elemento  $j$  em cada um dos ésteres, sendo dada por:

$$w_{ji} \left[ \frac{\text{kg elemento } j}{\text{kg éster } i} \right] = \frac{n^{\circ} \text{ átomos do elemento } j \times M_j}{M_i} \quad (3.7)$$

Sendo  $M$  a massa molar. Deste modo, a fórmula empírica geral da mistura de ésteres é dada por  $C_x H_y O_z$ , onde:

$$x = \frac{\left( \frac{w_{C,bs}}{12} \right)}{\text{mínimo} \left( \frac{w_{C,bs}}{12}; \frac{w_{H,bs}}{1}; \frac{w_{O,bs}}{16} \right)} \times 2 \quad (3.8)$$

$$y = \frac{\left( \frac{w_{H,bs}}{1} \right)}{\text{mínimo} \left( \frac{w_{C,bs}}{12}; \frac{w_{H,bs}}{1}; \frac{w_{O,bs}}{16} \right)} \times 2 \quad (3.9)$$

$$z = \frac{\left( \frac{w_{O,bs}}{16} \right)}{\text{mínimo} \left( \frac{w_{C,bs}}{12}; \frac{w_{H,bs}}{1}; \frac{w_{O,bs}}{16} \right)} \times 2 \quad (3.10)$$

Com esta fórmula empírica é possível determinar a fórmula empírica dos triglicerídeos, sabendo que são necessários três ésteres e um glicerol para formar um triglicerídeo. Para tal, retira-se a cada éster um grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ), porque a reacção de transesterificação decorreu na presença de metanol e adiciona-se a cadeia correspondente ao glicerol. Deste procedimento resultam as equações 3.11, 3.12 e 3.13, sendo a fórmula empírica média dos triglicerídeos dado por  $\text{C}_{xx}\text{H}_{yy}\text{O}_{zz}$ , onde:

$$xx = (3 \times x) \quad (3.11)$$

$$yy = (3 \times y) - 4 \quad (3.12)$$

$$zz = (3 \times z) \quad (3.13)$$

É de notar que o OAU além de conter triglicerídeos é também constituído por ácidos gordos livres. Para determinar a sua massa molar com maior rigor seria necessário proceder à sua identificação por cromatografia. Contudo, neste trabalho, uma vez que o valor ácido não é elevado (como se constatará na secção 0) não se determinou a massa molar dos ácidos gordos livres, assim assumiu-se que a massa molar dos triglicerídeos corresponde à massa molar média do OAU.

#### 3.3.1.7 Teor em ésteres

A cromatografia gasosa é uma técnica muito poderosa na determinação de composições, mesmo quando se fala de concentrações baixas. No presente trabalho a CG permitiu identificar e quantificar os ésteres metílicos. Posteriormente calculou-se a percentagem de ésteres metílicos existentes nas amostras (mistura reaccional ou biodiesel final) e determinou-se o índice de iodo.

A referida determinação foi efectuada num cromatógrafo Varian 3800-CP da Varian Inc., com detector FID, usando hélio como gás de arraste, com um fluxo de 2,0 mL/min e uma coluna capilar Varian CP Select™ Biodiesel for FAME com 30 m de comprimento, 0,320 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de espessura de filme.

Em todas as análises, o programa de temperatura da coluna foi: temperatura inicial do forno de 80°C, rampa de 5°C/min até 200°C e tempo de espera de 1 minuto. A temperatura do injector e do detector foi mantida a 250 e 260°C, respectivamente. A injeção das amostras foi feita no modo “split” com uma razão de 1:20.

Na análise das amostras por GC-FID é necessário a derivatização da amostra por sililação, que consiste na substituição do grupo hidroxilo do ácido por um grupo sililo (Maurício, 2008). O objectivo da sililação consiste em substituir ou inserir determinados grupos de compostos da amostra para aumentar a sensibilidade da técnica de análise, facilitar a identificação de compostos ou ainda para prevenir a degradação da amostra ou da própria coluna cromatográfica.

A obtenção de derivados sililados elimina a presença dos grupos OH e NH<sub>2</sub> presentes nestas substâncias e que são responsáveis pelo seu mau comportamento cromatográfico. A reacção de derivatização utilizada ocorre por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (SN<sub>2</sub>), em que há substituição dos hidrogénios activos por grupos TMS (trimetilsililo) (Oliveira, 2009).

Uma vez concluída a derivatização das amostras garante-se que, por um lado, a reacção é interrompida após as amostragens, e por outro, que os ácidos e álcoois presentes na amostra não ficam adsorvidos à coluna do cromatógrafo. O procedimento que de seguida se descreve apenas foi aplicado nas amostras de mistura reaccional recolhidas ao longo do tempo:

- a. Sililação de 30 µL de amostra, previamente pesada, por adição de 100 µL de piridina, 100 µL de N,O-Bis(trimetilsilano)trifluor acetamida e 50 µL de clorotrimetilsilano. Pesas a amostra com os três reagentes sililantes adicionados;



- b. Digestão em banho de óleo a 70-80°C durante 30 minutos;
- c. Congelamento das amostras;
- d. Preparação da solução de metil heptadecanoato (padrão interno), em n-heptano, com uma concentração de 10 mg/mL;
- e. Adição de 250 µL da solução preparada anteriormente a 200 µL de amostra sililada (previamente pesada);
- f. Injecção de 0,5 µL de amostra no cromatógrafo;

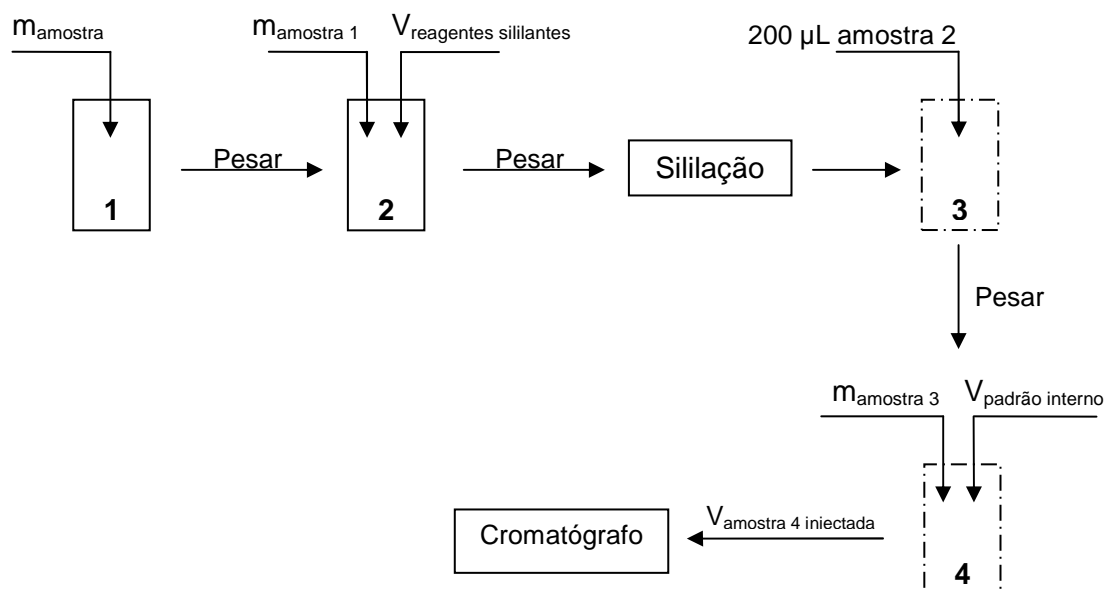
O uso de um padrão interno de referência é necessário, uma vez que permite a análise dos picos obtidos tendo por base a sua comparação, ou seja, permite quantificá-los.

O cálculo da concentração em ésteres teve em conta a seguinte expressão (EN 14103:2003):

$$C_{\text{ésteres}} [\%] = \frac{(\sum A_E) - A_{MH}}{A_{MH}} \times \frac{C_{MH} [\text{mg/mL}] \times V_{MH} [\text{mL}]}{m_{\text{amostra 3}} [\text{mg}]} \quad (3.14)$$

Em que  $\sum A_E$  corresponde ao somatório das áreas ocupadas por cada éster;  $A_{MH}$ ,  $C_{MH}$  e  $V_{MH}$  correspondem respectivamente à área do pico, à concentração e ao volume do padrão interno.

A Figura 3.2 ilustra a preparação das referidas amostras, bem como a nomenclatura utilizada.



**Figura 3.2** Procedimento adoptado na sililação e preparação das amostras para análise por CG.

### 3.3.2 Pré-tratamento do OAU

Sempre que a matéria-prima tenha sido sujeita a processos potencialmente contaminantes, como fritura de alimentos, por exemplo, é conveniente proceder a um pré-tratamento antes de ser utilizada. Este pré-tratamento visa eliminar as impurezas e os compostos indesejáveis, de modo a que o rendimento do processo seja superior e/ou que o produto obtido apresente melhor qualidade. A conversão dos óleos e gorduras em ésteres pressupõe uma preparação da matéria-prima, com o objectivo de criar as melhores condições conducentes a uma taxa de conversão máxima. Como já referido anteriormente, no caso da catálise homogénea a matéria-prima deve apresentar um baixo teor de humidade, pelo que deve ser submetida a secagem e deve, ainda apresentar um baixo nível de acidez o que implica a sua neutralização, através de uma lavagem com solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio ou esterificação com catalisador ácido.

Assim, dependendo do composto a eliminar/reduzir, os óleos vegetais e gorduras animais podem sofrer diversos tipos de tratamento, como sejam a redução de ácidos gordos livres, remoção de gomas e resíduos sólidos, filtração, secagem, branqueamento e desodorização (Felizardo, 2003).

Após o pré-tratamento, a matéria-prima deverá possuir uma composição que permita a sua utilização no processo de produção de biodiesel, sem comprometer o seu rendimento ou a qualidade do produto final.

No presente trabalho, o OAU utilizado nos diversos ensaios não sofreu qualquer tipo de pré-tratamento; a filtração foi prescindível pois com o repouso da amostra os sólidos suspensos sedimentaram. O teor de humidade e o valor ácido da amostra, como se verá posteriormente apresentam valores baixos.

### 3.3.3 Reacção de transesterificação

Como mencionado anteriormente, o rendimento da reacção de transesterificação depende de diversos factores, sendo um deles a massa de catalisador. Em relação à quantidade a adicionar ao sistema reaccional, esta é dada pela equação seguinte:

$$m_{\text{catalisador}} [\text{g}] = \frac{m_{\text{OAU}} [\text{g}] \times \text{razão mássica de catalisador} [\%]}{100} \quad (3.15)$$

Visto que a massa de OAU foi determinada directamente por gravimetria, é fácil determinar o volume utilizado no respectivo ensaio, bastando conhecer a sua densidade. O conhecimento do volume de OAU torna-se importante quando usado solvente (normalmente expresso em % v/v, em relação ao volume de OAU).

Para desenvolver a reacção de transesterificação foram necessários diversos materiais, sendo eles:

- |                                   |                             |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| ▪ Ampola de decantação            | ▪ Frascos de vidro (1 L)    |
| ▪ Estufa                          | ▪ Placa de agitação orbital |
| ▪ Evaporador rotativo sob pressão | ▪ Termómetros               |
| ▪ Frascos de vidro (500 mL)       | ▪ Outro material diverso    |

Para se manter a temperatura constante, a reacção foi mantida num sistema climatizado (estufa), à temperatura pré-estabelecida (40°C) para a realização dos ensaios.

Antes de se dar início à reacção de transesterificação a enzima foi pré-tratada tendo por base, o descrito por Lai *et al.* (2005). O procedimento adoptado foi o seguinte:

- Suspender 150 g de enzima em 150 mL de t-butanol durante 1h à temperatura ambiente;
- Remover o solvente por decantação;

- c. Incubar a enzima em 150 g de OAU a 40°C e 200 rpm durante 1h.

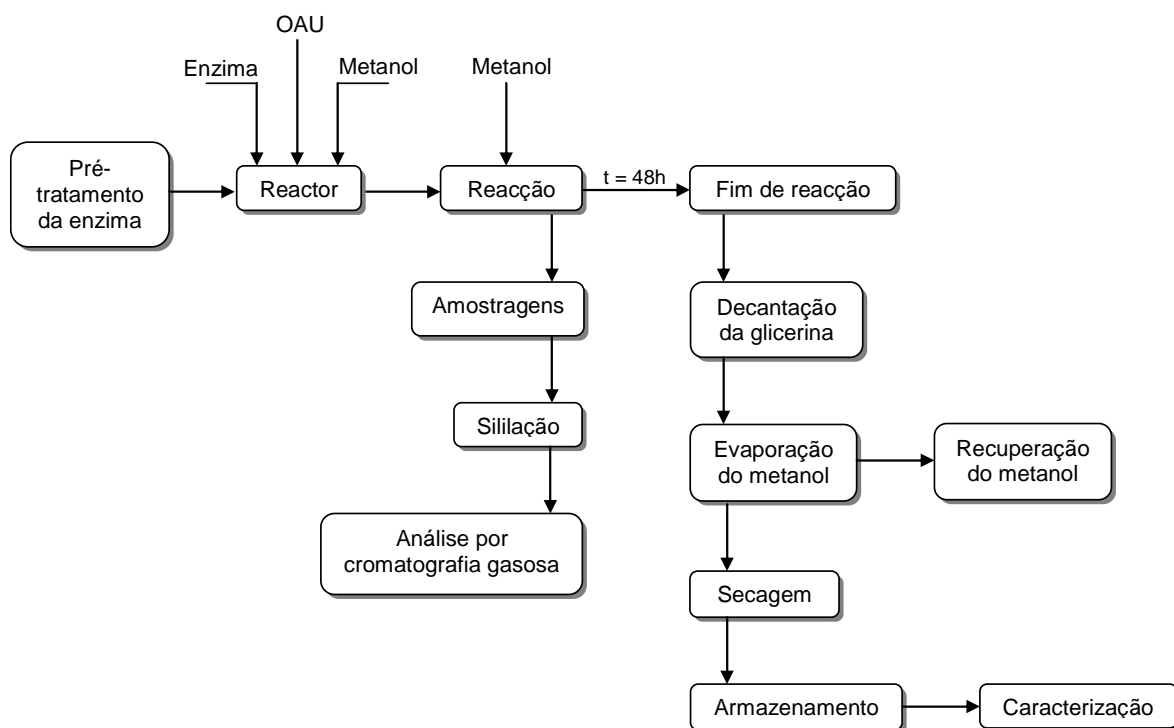
Concluído o pré-tratamento da enzima dá-se início à reacção de transesterificação, procedendo-se à mistura de 150 g de OAU e 15 g de enzima (razão mássica catalisador:OAU = 10%). O reactor usado na realização dos diversos ensaios foi um frasco de vidro roscado de 500 mL ou 1L da Duran® de forma a maximizar a superfície de contacto entre as enzimas e os reagentes. Para que a agitação não afectasse a integridade física das enzimas, recorreu-se a uma placa de agitação orbital colocada dentro da estufa. A mistura reaccional permaneceu nestas condições durante 48 h, ou seja, cada ciclo teve a duração de 48 h.

Como já referido anteriormente, adoptaram-se dois métodos distintos:

1. Recorreu-se à adição de metanol por quatro estágios (cada um com uma razão molar metanol:OAU de 1:1) às 0, 12, 24 e 36 horas de tempo reaccional.

As amostragens foram realizadas às 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 e 48 horas. Sempre que a etapa de adição do álcool coincidiu com um momento de amostragem, esta foi última foi feita primeiro.

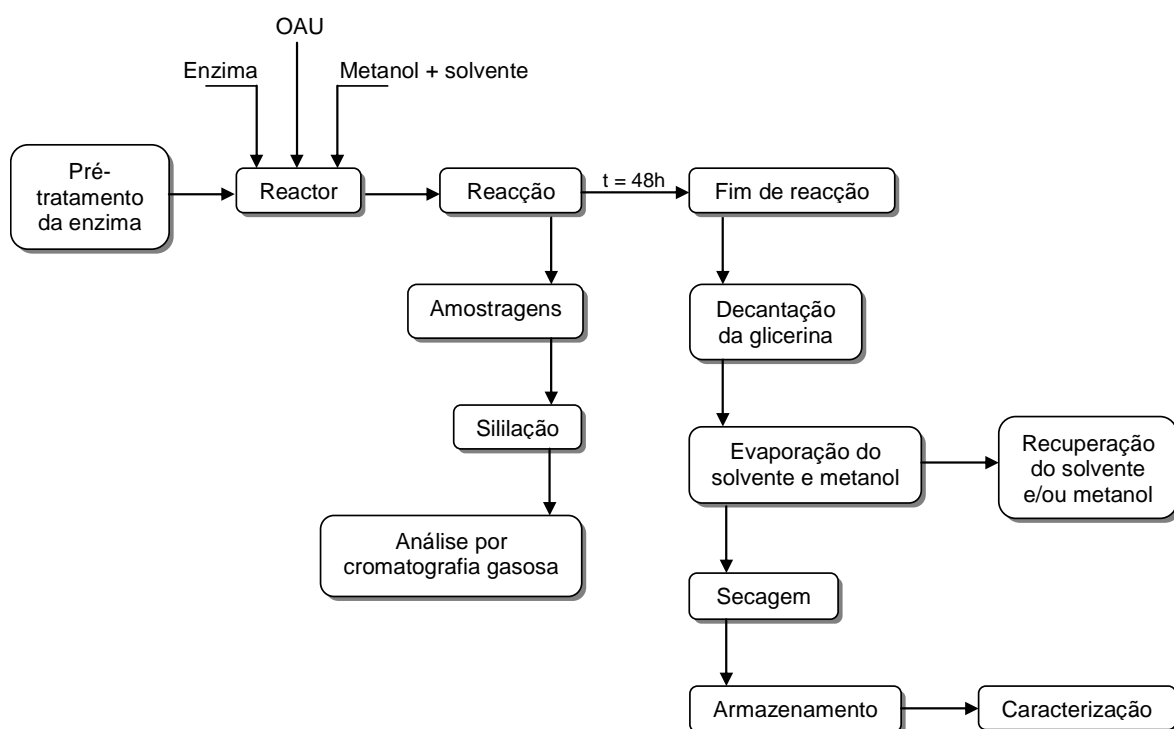
O esquema que se segue representa as principais etapas realizadas.



**Figura 3.3** Esquema do procedimento experimental num sistema de adição de metanol por estágios.

2. O outro método prescinde da adição de metanol por estágios, sendo necessário usar um solvente à mistura reaccional. Quando este foi o método aplicado, a reacção de transesterificação iniciou-se com a adição da mistura de metanol (volume total usado no ensaio) e solvente ao reactor que continha o óleo e a enzima, pois esta já tinha sofrido pré-tratamento. As amostragens foram realizadas às 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 30, 36 e 48 horas de reacção. Também neste caso as amostras recolhidas foram submetidas a derivatização por sililação e preservadas no congelador até posterior análise no CG.

A figura seguinte ilustra as principais etapas envolvidas neste processo.



**Figura 3.4** Esquema do procedimento experimental num sistema com uso de solvente.

Em ambos os métodos, após todos os ensaios realizados, isto porque a enzima utilizada nos ensaios com adição de metanol por estágios e uso de solvente foi sempre a mesma, ou seja, a utilizada no primeiro ensaio, pois pretende-se estudar a sua perda de actividade ao longo dos diversos ciclos; o catalisador foi recuperado da mistura reaccional por filtração. O catalisador recuperado foi regenerado por meio de lavagem com álcool isopropílico e acondicionado num recipiente, para reutilização.

### **3.4 Conclusão**

Neste capítulo foi apresentada a metodologia de ensaios adoptada ao longo do estudo, bem como os diversos ensaios realizados com a pretensão de avaliar a perda de actividade da enzima Novozyme<sup>®</sup> 435 ao longo de utilizações consecutivas. Para tal realizaram-se ensaios com adição de metanol por estágios e com uso de solvente (t-butanol), sendo em ambos os métodos mantidas as mesmas condições operatórias (razão mássica catalisador:OAU=10%, razão molar metanol:OAU=4:1, T=40°C e 200 rpm). A necessidade de adoptar métodos distintos na reacção de transesterificação deve-se à elevada sensibilidade das lipases a certas condições de temperatura, agitação e toxicidade ao metanol. Em todos os ensaios foram retiradas amostragens ao longo do tempo, estas foram mais frequentes nos momentos iniciais da reacção (onde se prevê maiores velocidades de reacção), sendo mais espaçadas na parte final (onde a velocidade de reacção deve diminuir devido ao consumo dos reagentes).

Previamente à realização dos ensaios foi imprescindível caracterizar o OAU, pois só deste modo se tornou possível assegurar algumas variáveis necessárias à concretização da reacção de transesterificação (e esterificação).

Pode-se concluir ainda que a reacção de transesterificação independentemente do método seleccionado necessita de condições operacionais adequadas. A análise dos resultados obtidos através dos diversos métodos é essencial para interpretar e avaliar a sua influência na cinética, rendimento da reacção e perda de actividade da enzima.

## **4 Resultados e discussão**

### **4.1 Introdução**

Com os resultados obtidos ao longo dos diversos ciclos pretende-se avaliar a perda de actividade catalítica da enzima Novozyme<sup>®</sup> 435 e constatar em qual dos métodos, com uso de solvente ou adição de metanol por estágios, esse efeito é mais notório.

A componente experimental do presente trabalho iniciou-se pela caracterização da matéria-prima, i.e. o OAU (vide secção 4.2), seguindo-se a realização da reacção de transesterificação com vista à produção de biodiesel.

Note-se que a enzima catalisa quer a reacção de transesterificação, quer a de esterificação. Porém, como o teor em ácidos gordos livres (FFA) do OAU utilizado é baixo (como se verá na secção 4.2.4) a reacção de esterificação não é preponderante face à de transesterificação, na produção de ésteres alquílicos (biodiesel). Por este motivo, nesta dissertação usa-se simplificadaamente a expressão “reacção de transesterificação”, quando na realidade são ambas as reacções que ocorrem.

Os resultados dos vários ensaios realizados encontram-se na secção 4.3, enquanto que na secção 4.4 são apresentados os resultados obtidos da caracterização do biodiesel. Por fim, na secção 4.5 são referidas as principais conclusões desta componente experimental.

## 4.2 Caracterização do OAU

Primeiramente, a matéria-prima (OAU) a usar no presente trabalho foi caracterizada, tendo em conta os seguintes parâmetros: viscosidade, densidade, teor de humidade, valor ácido e massa molar.

### 4.2.1 Viscosidade

A viscosidade cinemática foi determinada de acordo com o descrito na secção 3.3.1.2. Realizaram-se três ensaios cujos resultados se encontram na seguinte tabela:

**Tabela 4.1** Viscosidade cinemática do OAU ( $T=40^{\circ}\text{C}$ ).

Réplica	$\Delta t$ [s]	$c$ [ $\text{mm}^2/\text{s}^2$ ]	$\nu$ [ $\text{mm}^2/\text{s}$ ]
1	526		54,95
3	531	0,10446	55,47
3	531		55,47

O valor médio da viscosidade cinemática do OAU é  $55,29 \text{ mm}^2/\text{s} \pm 0,30$ . Este valor é da mesma ordem de grandeza dos encontrados na bibliografia, porém é um pouco superior (cerca de 29%) ao determinado por outros autores (e. g. Azocar *et al.*, 2010 e Predojevic, 2008). Esta propriedade depende do tipo de óleo e também do seu tempo de utilização. Portanto, pode-se concluir que o OAU utilizado neste estudo, possivelmente foi submetido a tempos de fritura mais prologados e o óleo virgem que lhe deu origem pode não ser do mesmo tipo dos estudados pelos outros autores.

### 4.2.2 Densidade

A densidade do OAU foi determinada usando um densímetro de acordo com o descrito na secção 3.3.1.1. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela seguinte:

**Tabela 4.2** Densidade do OAU.

Réplica	$\rho$ [g/L] @ $20^{\circ}\text{C}$	$\bar{\rho}$ [g/L] @ $15^{\circ}\text{C}$
1	910	
2	910	910,1
3	910	



O valor da densidade média do OAU (910,1 g/L) foi obtido através da Equação 3.1. Este valor encontra-se na gama de valores determinados por outros autores (e. g. Sonare & Rathod, 2010, Azocar *et al.*, 2010, Leung *et al.*, 2009, Predojevic, 2008, Kaya *et al.*, 2009 e Barnwal and Sharmar, 2005).

#### 4.2.3 Teor de humidade

Seguindo o procedimento exposto na secção 3.3.1.3, determinou-se o teor de humidade ( $w_{w,OAU}$ ) do OAU pela equação 3.3.

**Tabela 4.3 Teor de humidade do OAU.**

Réplica	$w_{w,OAU}$ [%]	$w_{w,OAU\text{médio}}$ [%]
1	0,08583	0,08488 ± 0,007931
2	0,07652	
3	0,09229	

Assim, o OAU apresenta um teor de humidade de aproximadamente 0,08%.

O teor de humidade de um óleo alimentar usado depende das condições de fritura e armazenamento a que foi sujeito. Assim, é expectável que diferentes autores tenham trabalhado com amostras de diferentes teores de água. Por exemplo, Dias *et al.* (2008) encontraram valores de 0,05%, enquanto que a amostra de Baustista *et al.* (2009) foi bastante superior: 0,17%.

Como já foi mencionado na secção 2.3.7, o teor de humidade para catálise homogénea é importante ser baixo (<0,3%, segundo Felizardo *et al.*, 2006). Em contrapartida, na catálise enzimática a presença de água pode até ser benéfica no rendimento da reacção.

#### 4.2.4 Valor ácido

O valor ácido, ou índice de acidez, foi determinado pelo método titrimétrico descrito na secção 3.3.1.5. Os resultados obtidos encontram-se na tabela que se segue:

**Tabela 4.4 Valor ácido do OAU.**

Réplica	V <sub>NaOH</sub> gasto [mL]	Valor ácido [mg KOH/g OAU]
1	0,8	1,226
2	0,8	
3	0,8	

O valor ácido da amostra de OAU é 1,226 mg KOH/g OAU.

Tendo em conta os resultados obtidos por outros autores como Azocar *et al.* (2010), Leung *et al.* (2009), Predojevic (2008), Maceira *et al.* (2009) e Dias *et al.* (2008)), o valor ácido da amostra de OAU utilizada neste estudo apresenta um valor semelhante. Visto tratar-se de um óleo vegetal que já foi submetido ao processo de fritura, o seu valor ácido é relativamente baixo.

#### **4.2.5 Massa molar**

A massa molar do OAU foi determinada de acordo com o exposto na secção 3.3.1.6, sendo esta considerada aproximadamente igual à massa molar da mistura de triglicerídeos.

Tendo por base os dados que constam na bibliografia para o caso do óleo de amendoim, procedeu-se à determinação do perfil em ésteres do OAU. Os resultados obtidos com o auxílio da cromatografia gasosa (CG), assim como o peso molecular dos respectivos ésteres encontram-se sumariados na tabela seguinte:

**Tabela 4.5** Dados necessários à determinação da massa molar do OAU.

Ácido gordo		Fórmula empírica do éster metílico	$M$ [g/mol]	$w_{i,bs}$ [kg i/kg biodiesel bs]
Ácido láurico	C12:0	$C_{13}H_{26}O_2$	214	0,0005
Ácido mirístico	C14:0	$C_{15}H_{30}O_2$	242	0,0011
Ácido palmítico	C16:0	$C_{17}H_{34}O_2$	270	0,1250
Ácido margarico	C17:0	$C_{18}H_{36}O_2$	284	0,0006
Ácido esteárico	C18:0	$C_{19}H_{38}O_2$	298	0,0214
Ácido oleico	C18:1	$C_{19}H_{36}O_2$	296	0,4976
Ácido linoleico	C18:2	$C_{19}H_{34}O_2$	294	0,3387
Ácido $\alpha$ -linoleico	C18:3	$C_{19}H_{32}O_2$	292	0,0012
Ácido araquídico	C20:0	$C_{21}H_{42}O_2$	326	0,0119
Ácido bénico	C22:0	$C_{23}H_{46}O_2$	354	0,0020

Utilizando as Equações 3.7 a 3.10 obtém-se a fórmula empírica média para os ésteres metílicos da amostra:  $C_{19}H_{35}O_2$ .

Estando esta fórmula empírica determinada, é possível calcular a fórmula empírica média dos triglicerídeos do OAU, fazendo uso das Equações 3.11, 3.12 e 3.13. Sendo o resultado obtido  $C_{57}H_{101}O_6$ , correspondendo uma massa molar de 881 g/mol. Este valor encontra-se dentro da gama típica dos óleos alimentares usados que é possível encontrar em diversos artigos (e.g. Dias *et al.*, 2008, Felizardo *et al.*, 2006 e Salis *et al.*, 2008).

Como se conhece a natureza do óleo vegetal virgem que deu origem à amostra de OAU utilizado neste estudo, foi possível prever qualitativamente o perfil de ácidos gordos, a partir da composição típica média do óleo de amendoim (vide Tabela 4.6). Para tal assume-se que a composição de um OAU sofre apenas alterações ao nível do teor em ácidos gordos e no grau de (in)saturação, não sendo significativas as alterações ao nível do número de átomos de carbono (tamanho da cadeia).

**Tabela 4.6** Composição típica em ácidos gordos (% m/m) do óleo de amendoim refinado.

Óleo de amendoim	Composição em ácidos gordos (%m/m)											
	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0
a)	0,1	9,5	0,1	-	-	2,2	44,8	32,0	-	1,3	-	1,8
b)	0,1	11,1	0,2	0,1	-	2,4	46,7	32,0	1,3	1,6	2,9	-
c)	0,1	11,1	0,2	0,1	0,1	2,4	46,7	32,0	1,3	1,6	2,9	1,5
d)	0	8,17	0	-	-	1,73	54,15	27,46	0,90	2,42	2,92	1,83
e)	-	9,3-13	-	-	-	1,1-3,6	35,6-58,3	20,9-43,2	0,3-2,4	0,7-3,2	1,8-4,4	0,4-1,9

a) Chapman *et al.*, 1992

b) Stauffer, 1996

c) Brien, 1998

d) Pérez *et al.*, 2010e) Carrin *et al.*, 2010

Comparando a Tabela 4.5 e a Tabela 4.6, constata-se que os teores relativos a cada um dos ácidos gordos são semelhantes no óleo virgem e no usado. Contudo, em relação ao C18:1 e C18:2, no OAU apresentam valores mais próximos entre si, quando comparado com a referência e). Alerta-se para o facto de que estão a ser comparadas amostras de óleo, que apesar de serem ambas de amendoim, não provieram da mesma origem.

### 4.3 Reacção de transesterificação

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar a perda de actividade da enzima Novozyme<sup>®</sup> 435 devido à sua utilização sucessiva, com vista à produção de biodiesel.

O metanol quando presente em concentrações elevadas torna-se tóxico para as enzimas, contudo é um dos reagentes da reacção de transesterificação e como tal é imprescindível a sua presença no meio reaccional. De modo a contornar o problema, na bibliografia consultada encontram-se descritos alguns métodos que permitem o uso de metanol na catálise enzimática, nomeadamente: (i) a adição de metanol por estágios e (ii) o uso de solventes. Neste trabalho procedeu-se à reacção de transesterificação do OAU com metanol, realizando-se ambos os métodos em paralelo.

Aquando o uso de solvente efectuaram-se 3 ciclos consecutivos, sendo que num deles também se efectuou a lavagem/regeneração da enzima. No caso da adição de metanol por estágios, realizaram-se 4 ciclos consecutivos sendo que apenas no último houve necessidade de regenerar a enzima. É de relembrar que em ambos os métodos, quando a enzima é virgem, sofre pré-tratamento.

Com o intuito de maximizar a área de contacto entre os reagentes e o catalisador usaram-se frascos de vidro roscados de 1L, com uma base larga, no processamento da reacção. A manutenção da temperatura foi conseguida colocando os reactores dentro da estufa a 40°C. As fotografias do esquema experimental podem ser visualizadas de seguida:



**Figura 4.1** Fotografia do esquema experimental usado na reacção de transesterificação do OAU.

Nas secções que se seguem os resultados obtidos decorrentes da análise cromatográfica de cada amostra recolhida ao longo do tempo, são apresentados sob a forma de rendimento em ésteres,  $\eta_{\text{ésteres}}$ , obtido através da seguinte equação:

$$\eta_{\text{ésteres}} [\%] = \frac{m_{\text{mistura reaccional}} \times C_{\text{ésteres}} [\%]}{m_{\text{OAU}}} \quad (4.1)$$

Onde  $m_{\text{OAU}}$  corresponde à massa de OAU usada na reacção de transesterificação;  $m_{\text{mistura reaccional}}$  representa a massa total da mistura reaccional, que pelo princípio da conservação da massa será igual à massa inicial dos reagentes e solvente (quando aplicável) e  $C_{\text{ésteres}}$  a concentração em ésteres na mistura reaccional. Optou-se por apresentar os resultados sob a forma de  $\eta_{\text{ésteres}}$ , pois caso se apresentasse em termos de  $C_{\text{ésteres}}$ , não seria possível comparar os resultados obtidos em ambos os métodos, devido ao efeito da diluição do solvente; nem mesmo ao longo de cada ciclo no método de

adição de metanol por estágios, visto que a massa de mistura reaccional também sofreu alteração ao longo de ensaio, sempre que se adicionou metanol.

Na secção 4.3.1 apresentam-se os resultados dos ensaios realizados com uso de solvente, sendo os resultados obtidos pelo método de adição de metanol por estágios apresentados na secção 4.3.2. Por fim, na secção 4.3.3 são comparados os resultados obtidos por ambos os métodos referidos anteriormente.

#### **4.3.1 Método: uso de solvente**

Os ensaios que ocorreram com uso de solvente (t-butanol) foram praticados com uma razão volumétrica de 0,75 v/v (em relação ao volume de OAU), visto ter sido a usada por Amorim (2009) e em que obteve bons resultados, esta razão também é indicada como a óptima por outros autores (e. g. Li *et al.*, 2006).

No terceiro ciclo deste método procedeu-se à realização de um ensaio em simultâneo no qual a enzima foi regenerada, seguindo o procedimento descrito na secção 3.3.3, com o intuito de observar o comportamento da enzima após esta prática, bem como, o incremento ou não no rendimento de ésteres.

Assim, existem 3 ensaios em série em que a enzima não sofreu qualquer tipo de regeneração, cujos resultados são apresentados e discutidos na secção seguinte. Os resultados referentes à influência da regeneração no comportamento da enzima são apresentados na secção 4.3.1.2.

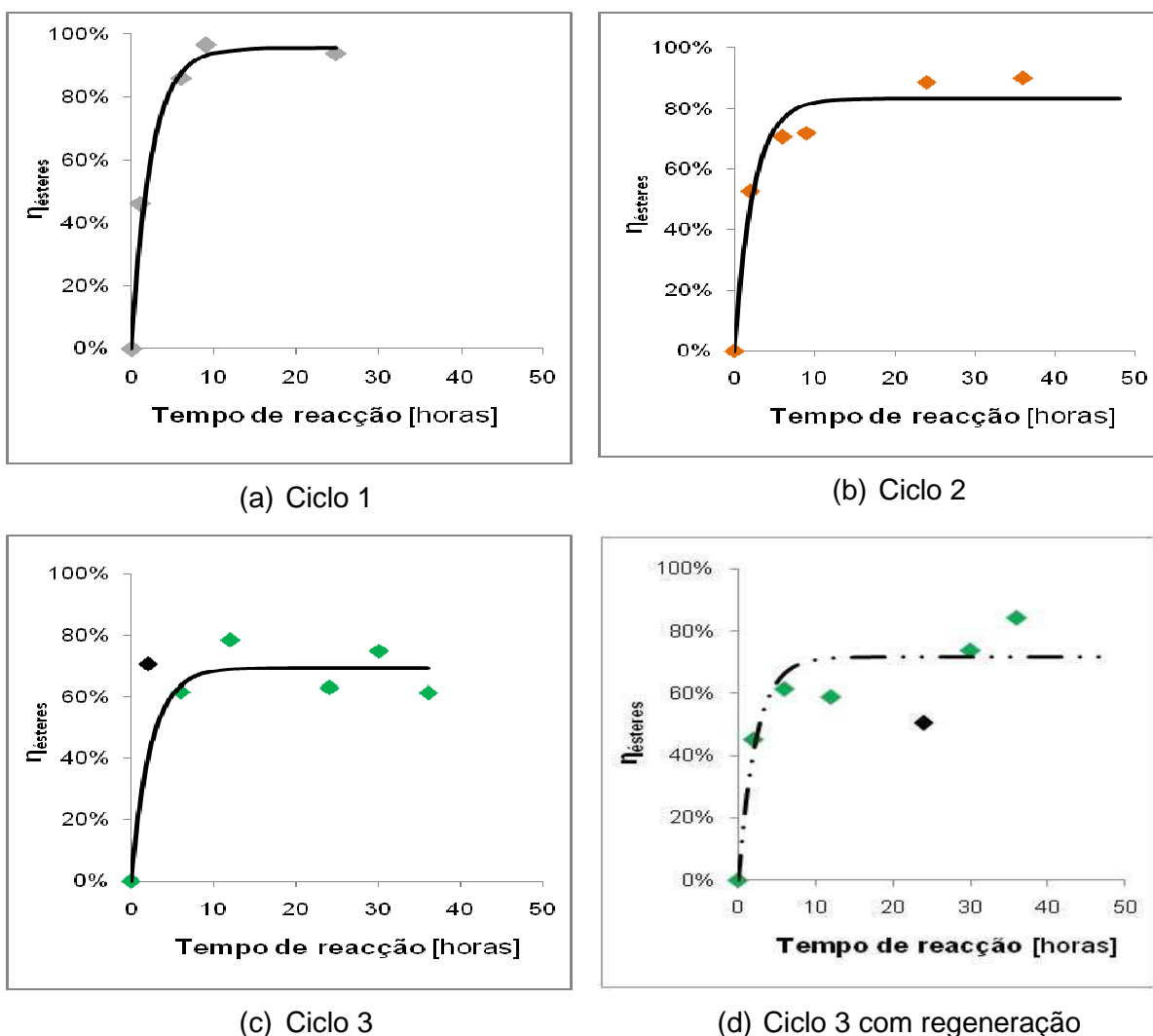
Nem todas as amostras recolhidas ao longo dos vários ensaios foram analisadas por cromatografia gasosa. De acordo com o procedimento experimental da secção 3.3.3, as amostras da mistura reaccional, foram sendo recolhidas, derivatizadas e congeladas até ao momento da sua caracterização. Observou-se posteriormente que algumas delas apresentavam sedimentos sólidos, o que inviabilizou a sua caracterização por CG. Isto justifica o facto do número de pontos que se apresenta na Figura 4.2 ser inferior ao número de amostragens efectivamente feitas. Noutros ensaios, por uma questão de racionalização de recursos, optou-se não analisar todas as amostras recolhidas, tendo sido previamente seleccionadas algumas.

Após a determinação do teor em ésteres das amostras analisadas nos vários ciclos/ensaios, calculou-se o rendimento em ésteres. Na Figura 4.2 encontram-se representados os resultados relativos aos ensaios com solvente. Nos vários gráficos que constituem a referida figura, traçaram-se curvas de tendência, de modo que fosse possível, de uma forma mais legível, comparar posteriormente os resultados numa só

figura. Ainda na referida figura, os pontos experimentais assinalados com a cor preta, significam que não foram contabilizados na representação da curva de tendência. Verificou-se que as curvas de tendência eram bem representadas por uma equação do tipo:

$$y = a \cdot (1 - \exp(-b \cdot t)) \quad (4.2)$$

Onde  $a$  representa o rendimento em ésteres [%] no estado de equilíbrio e  $b$  é uma constante. Esta equação não tem qualquer significado físico no que concerne à cinética da reacção de transesterificação. Trata-se apenas de uma equação matemática empírica que correlaciona de forma satisfatória os resultados experimentais obtidos. Contudo poderia ter sido aplicada uma outra em que também se obtivesse um bom ajuste dos resultados experimentais apresentados.



**Figura 4.2** Evolução do rendimento de ésteres dos ciclos realizados com uso de solvente  $T = 40^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, razão molar metanol:OAU=4:1, razão volumétrica *t*-butanol 0,75 v/v, razão mássica de catalisador=10% .

Da Figura 4.2 constata-se que todos os ciclos apresentam comportamentos semelhantes. No Ciclo 1 apenas estão representados quatro pontos experimentais, pois no momento de análise cromatográfica constatou-se que as restantes amostras estavam inviáveis de ser analisadas, devido à presença de partículas sólidas. No Ciclo 3, o ponto representado a preto não foi considerado na representação da curva de tendência, pois não faz qualquer sentido às 2 h de reacção o rendimento em ésteres ser 71%, quando posteriormente se regista que este rendimento só é alcançado próximo das 12 h de reacção. Neste ciclo, e devido à falta de informação nas primeiras horas de reacção, a variação do rendimento em ésteres centra-se na gama de 60 a 80%. Em relação ao Ciclo 3R, o ponto representado a preto, mais uma vez não foi considerado para a



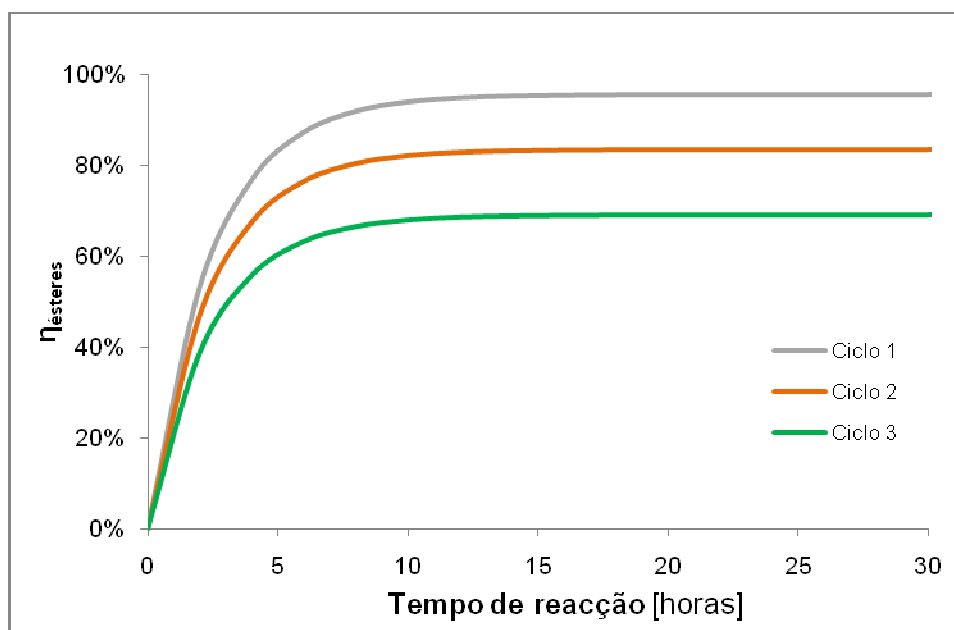
representação da curva de tendência, pois verificou-se que às 24 h de reacção o rendimento em ésteres era de 51%, o que, observando a Figura 4.2 d) se constata que esta ordem de grandeza é alcançada próximo das 12 h de reacção

Na Tabela 4.7 encontram-se compilados os valores do  $\eta_{\text{ésteres}}$  e do Declive Inicial das Curvas (DIC) de tendência referentes aos ciclos realizados com uso de solvente. Por sua vez, na Figura 4.3 estão representados graficamente as diversas curvas de tendência obtidas nos vários ensaios.

**Tabela 4.7** *Resumo dos valores do  $\eta_{\text{ésteres}}$  e do DIC nos ensaios com uso de solvente.*

Ciclos	$\eta_{\text{ésteres}}$	DIC
	[%]	[g ésteres/g mistura inicial/h]
1	95,5	0,22
2	83,4	0,20
3	69,2	0,16
3R	71,6	0,17

A velocidade inicial da reacção está traduzida na tabela anterior pelo DIC, onde se constata, e como era expectável, que a maior velocidade é alcançada no primeiro ciclo decrescendo ligeiramente à medida que a enzima vai sendo usada consecutivamente, sem sofrer qualquer processo de regeneração.

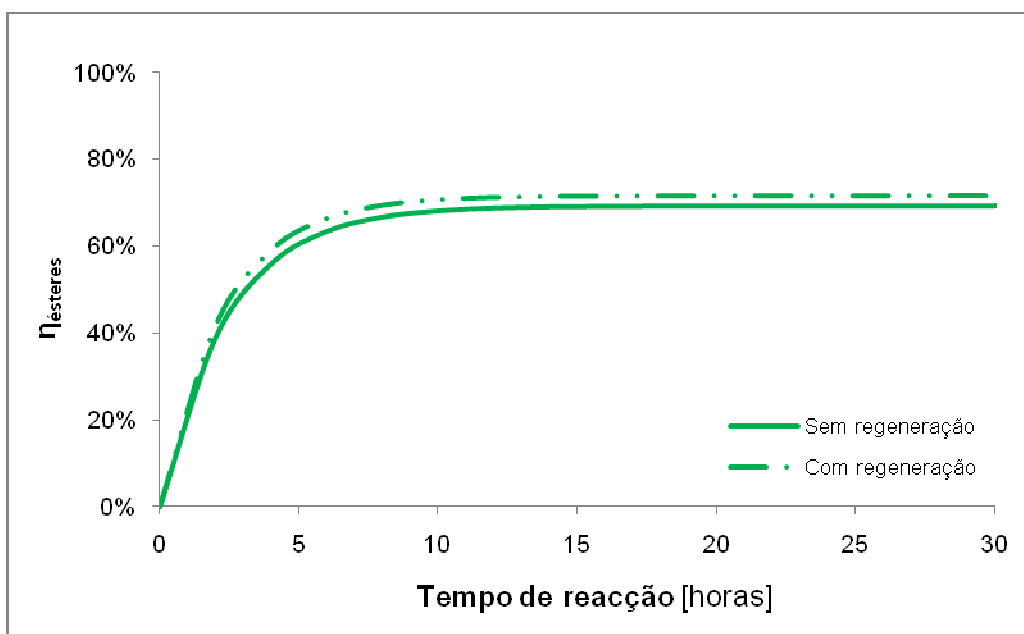


**Figura 4.3** *Rendimento em ésteres no estado de equilíbrio, nos ensaios com uso de solvente.*

Pela Figura 4.3 e como era de esperar, observa-se que o maior rendimento em ésteres (95,5%) é alcançado no Ciclo 1, sendo que este vai diminuindo até ao Ciclo 3 (69,2%). Todos os ciclos, sensivelmente às 2 horas de reacção, apresentam mais de 50% da conversão final. Após sensivelmente 15 horas de reacção não se verifica qualquer incremento no rendimento em ésteres, sendo assim alcançado o estado de equilíbrio, o que significa que os ensaios podiam ter terminado neste momento.

Após três ciclos sucessivos de utilização, a enzima Novozyme® 435 perde actividade, o que se reflecte na diminuição do rendimento de ésteres em cerca de 26% do primeiro para o terceiro ciclo. É de notar que no presente estudo não foi determinada a perda de actividade, nas unidades de actividade enzimática referidas na secção 2.4.2.

Como já referido anteriormente, em simultâneo com o Ciclo 3, realizou-se um ensaio em que a enzima sofreu regeneração. Assim, a enzima utilizada em ambos os ensaios do terceiro ciclo, proveio do Ciclo 2, sendo esta repartida equitativamente em dois frascos, com o intuito de observar o efeito da regeneração no desempenho da enzima. A Figura 4.4 apresenta o resultado da regeneração.



**Figura 4.4** Efeito da regeneração no rendimento em ésteres no Ciclo 3  $T = 40^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, razão molar metanol:OAU=4:1, razão volumétrica *t*-butanol 0,75 v/v, razão mássica de catalisador=10%.

Pela análise da Figura 4.4 observa-se que a regeneração da enzima tem efeito benéfico na reacção de transesterificação do OAU, pois verifica-se um aumento de 2,4% no rendimento de ésteres, face ao ensaio que decorreu sem regeneração. Também é possível afirmar que a velocidade inicial da reacção em ambos os ensaios é muito semelhante entre si, sendo ligeiramente superior no ensaio com regeneração da enzima.

Posto isto, conclui-se que o método adoptado para a regeneração da enzima, tendo em conta as condições operatórias do presente estudo, é favorável ao aumento da sua actividade catalítica, reflectindo-se assim no incremento do rendimento de ésteres. Contudo, é recomendável o estudo de outros métodos de regeneração com o objectivo de conseguir um incremento mais significativo após a realização de tal prática.

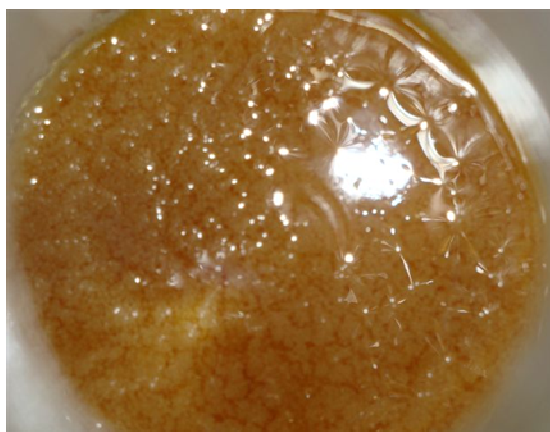
#### 4.3.2 Método: adição de metanol por estágios

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições operatórias do método anterior, de forma a permitir a comparação entre ambos.

Foram igualmente traçadas curvas de tendência aos resultados experimentais obtidos em cada ensaio, sendo que os pontos representados a preto não foram tidos em conta no ajuste destas. É importante referir que no final do Ciclo 3 observou-se que, a enzima continha muita glicerina adsorvida na sua superfície externa (vide Figura 4.5), tendo-se

optado por regenerar toda a massa de enzima, lavando-a com álcool isopropílico. De seguida levou-se a cabo mais um ciclo (4º) de utilização da enzima.

Note-se que até ao momento de realização do Ciclo 4 não se tinha efectuado qualquer análise cromatográfica às amostras recolhidas nos ciclos precedentes.

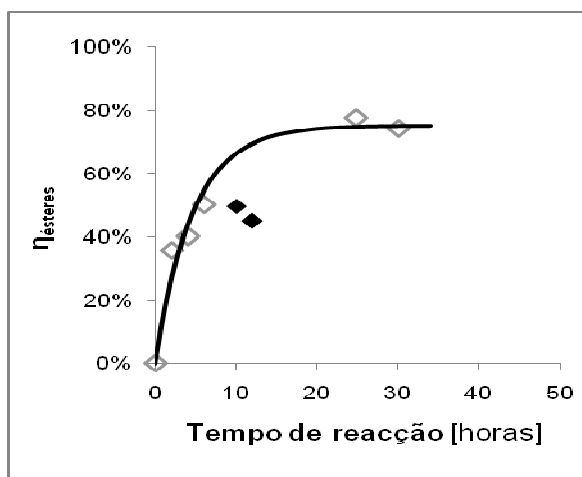


a) Antes da lavagem

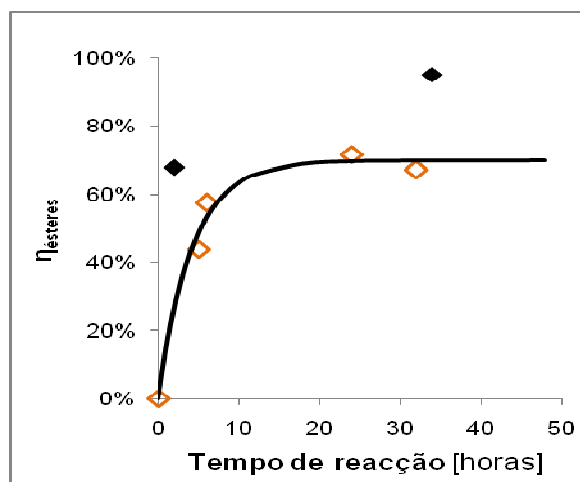


b) Após a lavagem

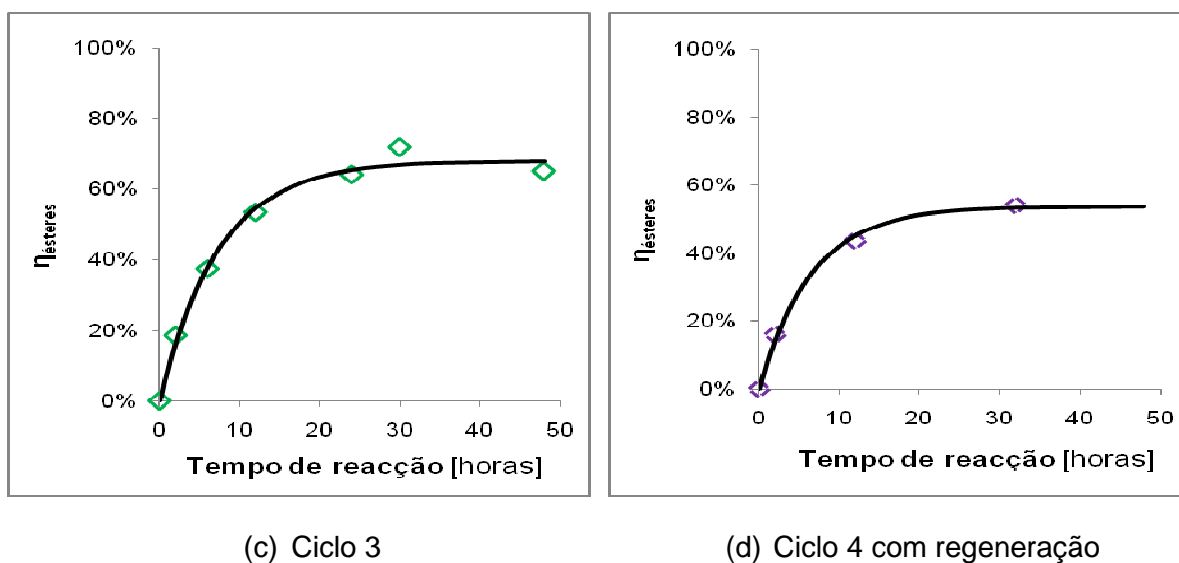
**Figura 4.5** Ilustração do aspecto da enzima antes a) e após a sua lavagem b).



(a) Ciclo 1



(b) Ciclo 2



**Figura 4.6** Evolução do rendimento em ésteres dos ciclos realizados com adição de metanol por estágios.  $T = 40^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, razão molar metanol:OAU=4:1 em quatro estágios, razão mássica de catalisador=10

Pela observação da figura anterior constata-se que no Ciclo 1, os pontos referentes às 10 e 12 h de reacção não foram tidos em conta no ajuste da curva de tendência, pois o rendimento em ésteres é de 50 e 45%, respectivamente. Tal facto, não faz qualquer sentido, uma vez que em ambos os pontos, o rendimento em ésteres é inferior ao apresentado às 6 h de reacção, o que se pode confirmar pela Figura 4.6 a). Pelo já exposto, no Ciclo 2 ambos os pontos representados a preto foram desprezados no ajuste da curva de tendência, por apresentarem valores descabidos no tempo reaccional em causa. O primeiro ponto, referente às 2 h de reacção apresenta um rendimento em ésteres de 68%, valor alcançado após as 6 h de reacção. Por sua vez, o outro ponto desprezado diz respeito às 34 h de reacção e apresenta um rendimento em ésteres de 95%; esta ordem de grandeza nunca foi alcançada ao longo deste ciclo, e mais ainda, nem no Ciclo 1 do presente método.

O Ciclo 4R, comparativamente com todos os outros ciclos, tem menor número de pontos experimentais, apenas três. Isto, deve-se ao facto do cromatógrafo ser partilhado com outros utilizadores, tendo havido a necessidade de trocar a coluna do equipamento, o que impossibilitou a análise de mais amostras do referido ciclo.

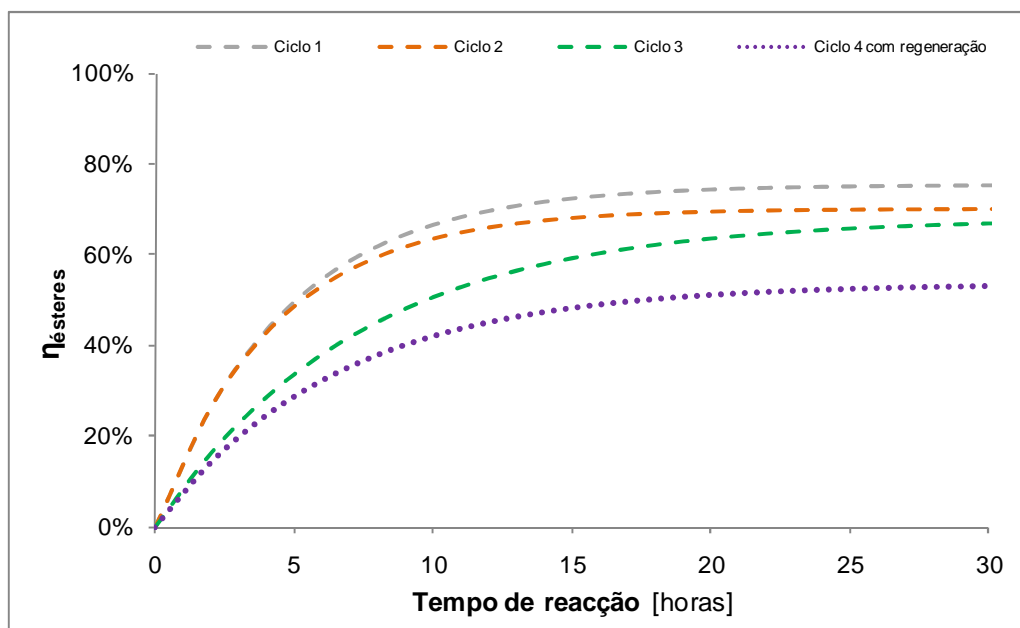
A Tabela 4.8 apresentada os valores do  $\eta_{\text{ésteres}}$  e do DIC referentes a todos os ciclos realizados com adição de metanol por estágios.

**Tabela 4.8** *Resumo dos valores do  $\eta_{\text{ésteres}}$  e do DIC nos ensaios com adição de metanol por estágios.*

Ciclos	$\eta_{\text{ésteres}}$	DIC
	[%]	[g ésteres/g mistura reaccional inicial/h]
1	75,2	0,12
2	69,9	0,12
3	67,9	0,08
4R	53,7	0,07

Da tabela anterior constata-se que do Ciclo 1 para o Ciclo 3 o rendimento em ésteres diminuiu aproximadamente 7%. A velocidade inicial da reacção é igual nos dois primeiros ciclos, decrescendo 33% no Ciclo 3. Deste último ensaio para o Ciclo 4R, o decréscimo do rendimento em ésteres foi superior ao verificado nos outros ciclos, sendo cerca de 14,2%. Apesar de, no último ensaio a enzima ter sido regenerada/lavada, não conseguiu “recuperar” a sua actividade. Este factor aliado à sua perda de actividade constatada entre ciclos, reflectiu-se no decréscimo do rendimento em ésteres, não se constatando alterações aparentes ao nível do DIC, apenas um ligeiro decréscimo. Também neste método, a velocidade inicial da reacção vai decrescendo até atingir um valor mínimo no quarto ciclo.

Na Figura 4.7 estão representadas graficamente as diversas curvas de tendência, com vista a facilitar a comparação da evolução da concentração de ésteres, ao longo dos quatro ciclos.

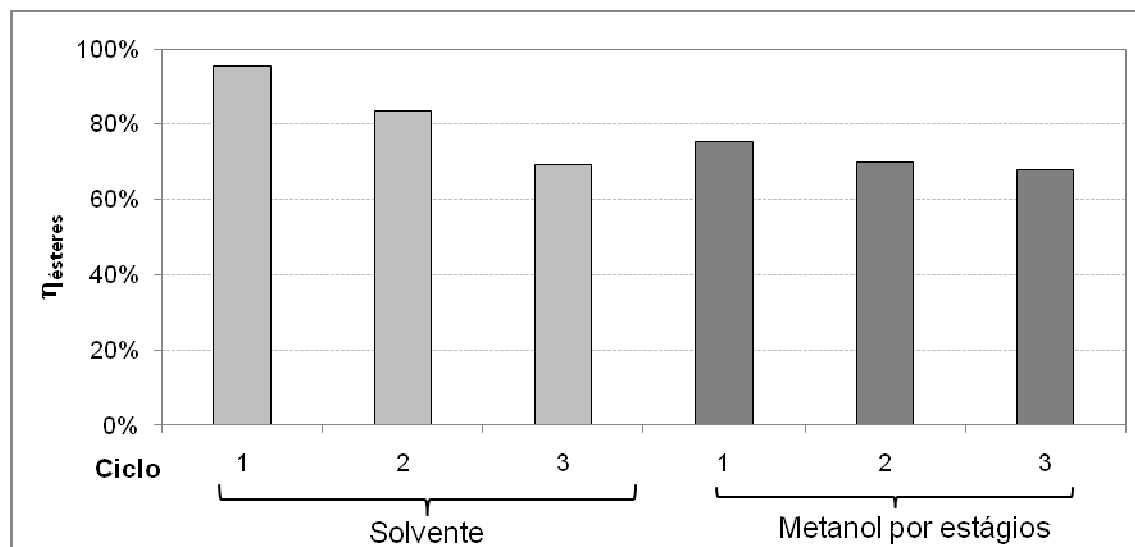


**Figura 4.7** *Rendimento em ésteres no estado de equilíbrio, nos ensaios com adição de metanol por estágios.*

Na figura anterior, optou-se por apresentar os resultados obtidos até às 30 horas de reacção, pois após este tempo reaccional o estado de equilíbrio já tinha sido alcançado, não havendo assim necessidade de representação de todo o tempo operacional. É possível observar a diminuição da concentração de ésteres de ensaio para ensaio. Nos dois primeiros ciclos às 4 horas de reacção alcança-se mais de 50% da conversão final. No caso do Ciclo 3 e 4 o mesmo se verifica, mas às 6 horas de reacção.

#### 4.3.3 Adição de metanol por estágios *versus* uso de solvente

Nesta secção são tecidas algumas comparações, a ambos os métodos estudados, apenas nos três primeiros ciclos. Na Figura 4.8 são apresentados os resultados do rendimento em ésteres obtidos nos dois métodos, e na Figura 4.9 as respectivas velocidades iniciais de reacção.



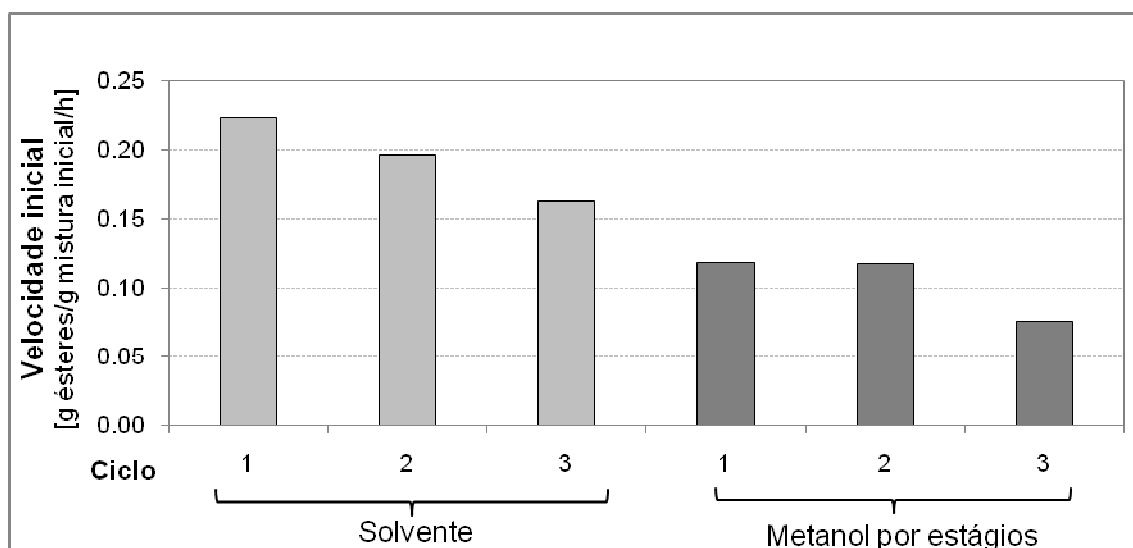
**Figura 4.8** Comparação do rendimento máximo de ésteres no método do uso de solvente e no método de adição de metanol por estágios ao longo dos ciclos  $T= 40^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, razão molar metanol:OAU=4:1, razão volumétrica *t*-butanol 0,75 v/v, razão mássica de catalisador=10%.

Devido à baixa solubilidade dos triglicerídeos no álcool e na glicerina, o metanol não dissolvido inibe a metanólise enzimática a razões molares metanol:óleo superiores a 1, daí a razão de se operar com adição de metanol por estágios ou uso de solvente. Através da adição de *t*-butanol ao meio reaccional, a conversão do óleo em ésteres aumentou notavelmente em relação ao método sem solvente sendo registado no Ciclo 1 um incremento de aproximadamente 20% e no Ciclo 2 de 14%, face aos mesmos ciclos, no método de adição de metanol por estágios. Porém, o mesmo não se verifica no Ciclo 3 onde o incremento é apenas de 1,3%, portanto, ao fim do terceiro ciclo, em ambos os métodos estudados, o rendimento em ésteres conseguido é muito semelhante. O constatado no presente estudo também é relatado por outros autores, como por exemplo, Royon *et al.* (2007).

Os compostos hidrofílicos (metanol e glicerina) são imiscíveis no meio reaccional (hidrofóbico). A glicerina adsorvida na superfície da enzima reduz a sua própria actividade. Contudo, o metanol é facilmente solúvel no *t*-butanol, mas o OAU é imiscível nos compostos hidrofílicos, o que se reflecte no menor rendimento em ésteres dos ensaios com adição de metanol por estágios. Como o *t*-butanol é um solvente moderadamente hidrofílico, solubiliza o OAU, o metanol e a glicerina.



Ainda de acordo com a figura anterior, é possível afirmar que a perda de actividade da enzima é mais acentuada nos ensaios com uso de solvente. Quando os ensaios são realizados com adição de metanol por estágios também se observa a perda de actividade da enzima, mas de uma forma mais gradual, apesar de o rendimento em ésteres alcançado ser inferior. Quando é usado solvente, a perda de actividade média entre ciclos ronda os 13%, sendo apenas de 4% no caso de adição de metanol por estágios.



**Figura 4.9** Comparação da velocidade inicial da reacção no método de uso de solvente e no método de adição de metanol por estágios ao longo dos ciclos de utilização consecutiva da enzima.

Da análise da Figura 4.9 é possível afirmar que as maiores velocidades iniciais da reacção dizem respeito aos ensaios realizados com adição de solvente, sendo praticamente o dobro das velocidades dos ensaios onde o metanol foi adicionado por estágios. Nos ensaios em que foi usado solvente, a diminuição da velocidade média entre ciclos é de 0,02 g ésteres/g mistura reaccional/h. Por sua vez, no método de adição de metanol por estágios, o decréscimo de velocidade inicial do Ciclo 2 para o Ciclo 3 é de 0,04 g ésteres/g mistura reaccional/h. Neste método, nos primeiros dois ciclos a velocidade inicial da reacção tem o mesmo valor. O verificado pode dever-se ao facto de que, nos ensaios com adição de solvente, por um lado a presença do solvente causa o efeito da diluição, mas por outro, funciona como tensioactivo, emulsionando o álcool e o OAU, facilitando o acesso à enzima (vide Figura 2.9). Para além disso, o solvente protege a enzima da toxicidade do metanol, evitando a sua desnaturação.

Na tabela que se segue está patente as concentrações iniciais dos reagentes da reacção:

**Tabela 4.9** Concentrações iniciais dos reagentes da reacção.

Método	Uso de solvente	Metanol por estágios
<b>C<sub>inicial</sub> MeOH</b> [g MeOH/g mistura reaccional]	0,08	0,03
<b>C<sub>inicial</sub> OAU</b> [g OAU/g mistura reaccional]	0,56	0,97

Pela tabela anterior é possível observar que a maior concentração inicial de metanol diz respeito ao método de uso de solvente, sendo a maior concentração inicial de OAU pertencente ao método de adição de metanol por estágios. Os resultados apresentados na Tabela 4.9 vêm confirmar ilações já referidas, nomeadamente respeitantes ao método de adição de metanol por estágios. Uma vez que a concentração de OAU é superior à concentração do metanol, sendo estes dois reagentes imiscíveis pode-se formar uma interface que impede o total contacto dos dois reagentes da mistura reaccional, evidenciando-se nos rendimentos em ésteres inferiores.

Pela Figura 4.3 e Figura 4.7, verifica-se que no método de adição de solvente o estado de equilíbrio é atingido mais rapidamente, comparativamente ao método de adição de metanol por estágios, havendo uma diferença de sensivelmente 5 h.

É de referir ainda que, o volume de biodiesel proveniente de ambos os métodos registou uma variação significativa antes e após a etapa de secagem na estufa, o que significa que foi removida alguma quantidade de metanol e/ou solvente não extraídas com o evaporador rotativo; possivelmente seria necessário mais tempo para a completa extracção. No Anexo C apresentam-se em maior detalhe as condições operatórias, bem como os respectivos resultados.

Na secção seguinte são apresentados os resultados obtidos na caracterização do biodiesel, o permitirá uma melhor avaliação da sua qualidade.

#### 4.4 Caracterização do biodiesel

A composição e as propriedades físicas e químicas do biodiesel dependem da natureza da matéria-prima utilizada, nomeadamente do comprimento e do grau de saturação dos ácidos gordos, e do respectivo processo de produção utilizado (Felizardo, 2003).

O principal objectivo do presente trabalho não é caracterizar o biodiesel obtido nos vários ciclos. Contudo, a título de curiosidade, optou-se por determinar algumas das suas propriedades.

Quando se fala na pureza/qualidade do biodiesel é necessário ter sempre em conta a EN ISO 14214:2003, com a respectiva referência a métodos/técnicas experimentais utilizados na determinação dos diversos parâmetros. No presente trabalho apenas foram determinados alguns parâmetros pela referida norma, particularmente: teor em ésteres (EN 14103:2003), viscosidade (adaptado da NP ISO 3104:1999) e densidade (ISO 3675:1998).

#### 4.4.1 Teor em ésteres

O teor de ésteres metílicos no biodiesel é um parâmetro previsto pela norma EN ISO 14214, cuja percentagem mínima exigida é de 96,5%, a ser determinada pelo método cromatográfico (EN ISO 14103). No presente trabalho, a determinação do teor de ésteres seguiu o procedimento descrito na secção 3.3.1.7, em que a massa do éster é obtida através da comparação da área total dos picos correspondentes com a área do pico metil heptadecanoato, utilizado como padrão de referência. Os resultados obtidos são apresentados na tabela seguinte:

**Tabela 4.10** Teor de ésteres das amostras finais analisadas por cromatografia gasosa.

Método	Ciclo	C <sub>ésteres</sub> na mistura final [%]
Uso de solvente	1	59,8
	2	58,0
	3	56,1
	3 R	52,3
Adição de metanol por estágios	1	65,9
	2	64,2
	3	80,6

A concentração de ésteres no Ciclo 1 (uso de solvente) diz respeito a um ensaio onde o rendimento em ésteres foi o mais elevado de todos, aproximadamente 96%. O que significa que os contaminantes a existir serão maioritariamente glicerina e eventualmente solvente e metanol (o excesso usado) mas o mais provável é que seja glicerina, porque o solvente e o metanol volatilizam com relativa facilidade a 100°C na estufa e também se assistiu à sua extracção no evaporador rotativo (sob vácuo).

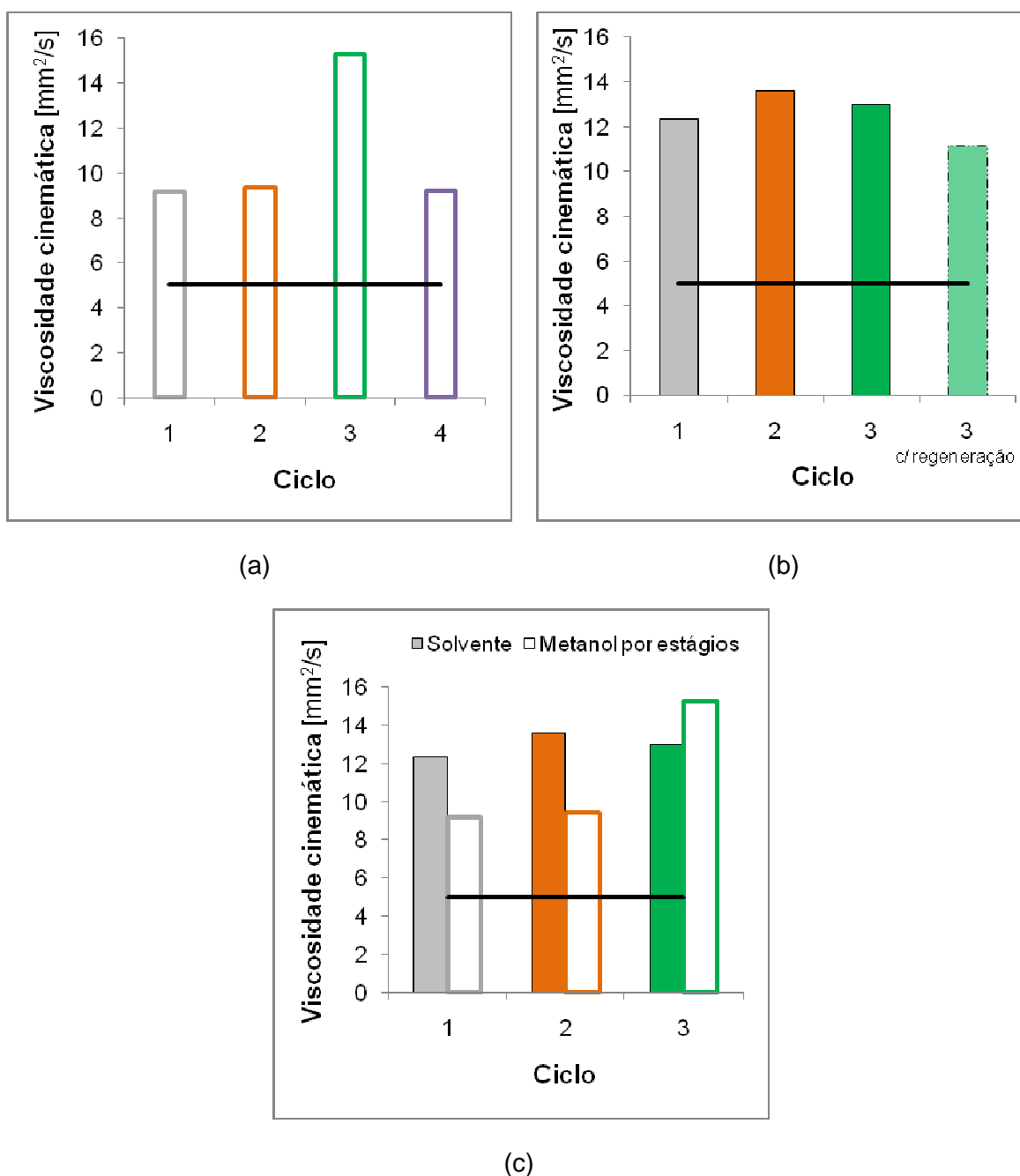
Todos os resultados apresentados na Tabela 4.10 não atingem a pureza mínima (96,5 % m/m) estabelecida na norma citada anteriormente. Portanto, a amostra analisada por CG contém contaminantes (mono, di e triglicerídeos que não reagiram, glicerina) o que se traduz na baixa concentração de ésteres. Contudo, é de salientar que o âmbito deste trabalho, de entre as três etapas que caracterizam a produção de biodiesel (pré-tratamento, reacção e purificação) foca-se apenas na etapa de reacção, portanto, como já referido anteriormente, a purificação das amostras de biodiesel consistiu em processos muito simples; apenas extracção de metanol e/ou solvente, bem como evaporação em estufa e separação da glicerina por gravidade. É de referir que não foi possível extrair o solvente e/ou metanol com o evaporador rotativo à pressão atmosférica e usando apenas a temperatura de ebulição dos compostos. Possivelmente houve a formação de mistura azeotrópica, o que obrigou a usar depressão na sua extracção.

Tendo em conta os procedimentos adoptados descritos anteriormente, conclui-se que estes foram mais eficazes nos ensaios com adição de metanol por estágios, traduzindo-se em concentrações de ésteres mais elevadas.

Como nenhuma das amostras analisadas atinge o teor de ésteres mínimo imposto pela norma EN ISO 14214:2003, o biodiesel produzido neste trabalho não apresenta condições para que possa ser utilizado como biocombustível.

#### **4.4.2 Viscosidade**

Tal como referido na secção 3.3.1.2, a viscosidade das amostras de biodiesel foi determinada com um viscosímetro “Cannon-Fenske”. As suas características, bem como, o procedimento adoptado estão relatados na referida secção.



**Figura 4.10** Viscosidade das amostras de biodiesel, a) metanol por estágios, b) solvente e c) ambos os métodos.

Nos ensaios realizados com adição de metanol por estágios (Figura 4.10a) os valores da viscosidade nos Ciclos 1 e 2 são muito semelhantes, contudo o valor apresentado no Ciclo 3 é muito discrepante em relação aos restantes.

Quando a reacção de transesterificação se realiza na presença de solvente, todos os ciclos apresentam valores sensivelmente na gama de 11 a 14 mm²/s, sendo o valor mais

baixo referente ao Ciclo 3 com regeneração. Quando foi efectuada a regeneração da enzima no Ciclo 3, o valor da viscosidade é inferior face ao mesmo ensaio sem regeneração (vide Figura 4.10b).

Comparando os valores da viscosidade obtidos nos ensaios com solvente e nos ensaios com adição de metanol por estágios, constata-se que nos Ciclos 1 e 2 os valores da viscosidade são superiores no método com solvente relativamente ao método de adição de metanol por estágios, verificando-se o oposto no Ciclo 3. Nos ensaios onde o rendimento em ésteres é superior, nomeadamente quando usado solvente, existem menos triglicerídeos não convertidos, então será a presença de glicerina a responsável pela maior viscosidade.

Portanto, diferentes viscosidades devem-se à reacção incompleta dos OAU ou à ineficiente purificação do biodiesel, deixando a glicerina livre ou conjugada na fase de ésteres metílicos.

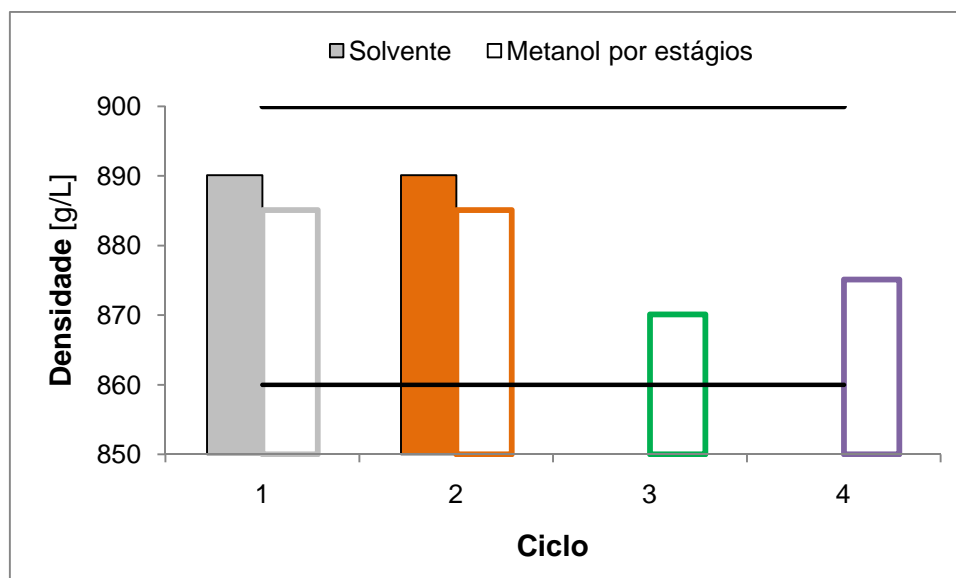
Biocombustíveis com valores de viscosidade superiores implicam um aumento de trabalho forçado pela bomba de combustível, conduzindo a um maior desgaste, bem como, má atomização do combustível com consequente combustão incompleta e aumento da libertação de fumos e partículas.

Concluindo, nenhuma das amostras de biodiesel analisadas, independentemente do método utilizado na reacção de transesterificação, cumpre os valores limite impostos pela norma EN ISO 14214:2003, cuja gama de variação é de 3,50 a 5,00 mm<sup>2</sup>/s (linha representada a preto na Tabela 4.11). Tal poderá significar que o biodiesel ainda contém glicerídeos que não reagiram e/ou glicerina.

#### **4.4.3 Densidade**

A densidade do biodiesel foi determinada através de um densímetro, como descrito na secção 3.3.1.1.

A norma ISO 3675 contém a expressão utilizada na correcção da densidade para a temperatura à qual o ensaio foi efectuado. A referida norma foi elaborada para petróleo bruto e produtos líquidos de petróleo.



**Figura 4.11** Densidade das amostras de biodiesel.

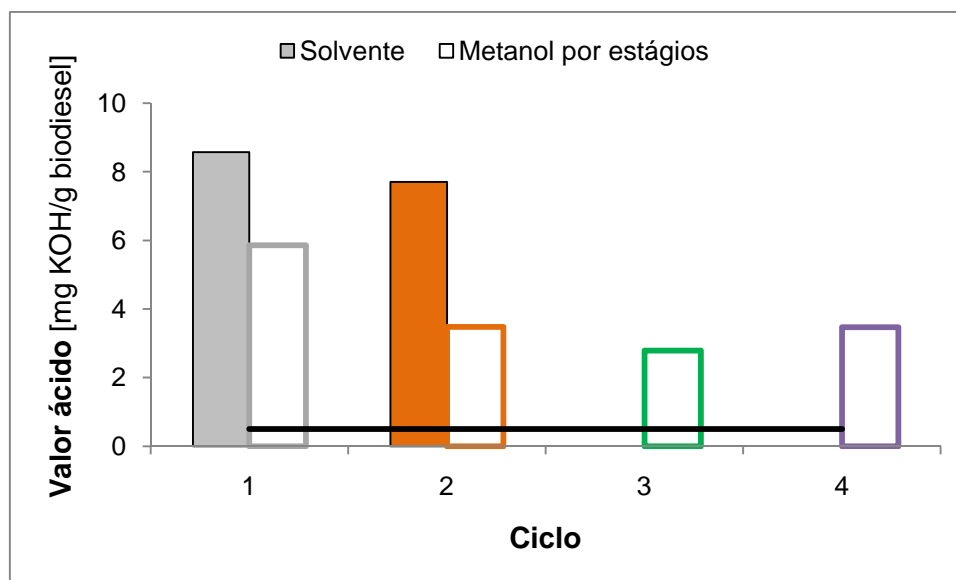
No Ciclo 3 e 3R do método com solvente e no Ciclo 4 do método de adição de metanol por estágios, não foi possível determinar a densidade do biodiesel devido à quantidade necessária ser insuficiente para efectuar a respectiva determinação, de acordo com o método adoptado no presente estudo.

Pela análise da Figura 4.11 verifica-se que no Ciclo 1 e 2 no método de uso de solvente, a densidade atinge os valores mais elevados, sendo muito semelhantes entre si. Em relação aos mesmos ciclos, mas no método de adição de metanol por estágios, também são os que apresentam densidade mais elevada. O valor mínimo da densidade do biodiesel é alcançado no Ciclo 3, sendo por conseguinte um pouco superior no Ciclo 4. Lembra-se que a densidade do OAU é de 910 g/L.

Todas as amostras de biodiesel obtidas nos diversos ciclos cumprem os limites impostos pela norma EN ISO 14214:2003, cujo valor mínimo é de 860 g/L e máximo de 900 g/L (linhas representadas a preto na Figura 4.11).

#### 4.4.4 Valor ácido

O procedimento adoptado na determinação do valor ácido encontra-se descrito na secção 3.3.1.5. A figura que se segue apresenta os valores obtidos.



**Figura 4.12** Valor ácido das amostras de biodiesel.

Pela análise da figura anterior, é possível afirmar que o valor ácido das amostras de biodiesel produzidas através do uso de solvente apresentam valores significativamente superiores às amostras obtidas pelo método de adição de metanol por estágios. Em relação a este último método, o valor ácido mais elevado diz respeito ao Ciclo1, diminuindo significativamente até ao Ciclo 3. Contudo, o valor obtido no Ciclo 4 é um pouco superior face ao valor precedente. Como a expressão do cálculo do valor ácido (vide Equação 3.14) necessita do valor da densidade da amostra e no caso do Ciclo 3 no método de adição de solvente, não foi possível determinar este valor, logo também não é possível obter o valor ácido da amostra em questão.

Como os valores da densidade obtidos nos diversos ciclos são bastante elevados, o valor ácido será afectado negativamente. Assim, será mais correcto realizar uma análise em termos de volume de titulante gastos na titulação de 1 mL de amostra. Na tabela que se segue são apresentados os referidos valores.



**Tabela 4.11** Volume de titulante gasto por mililitro de amostra na determinação do valor ácido.

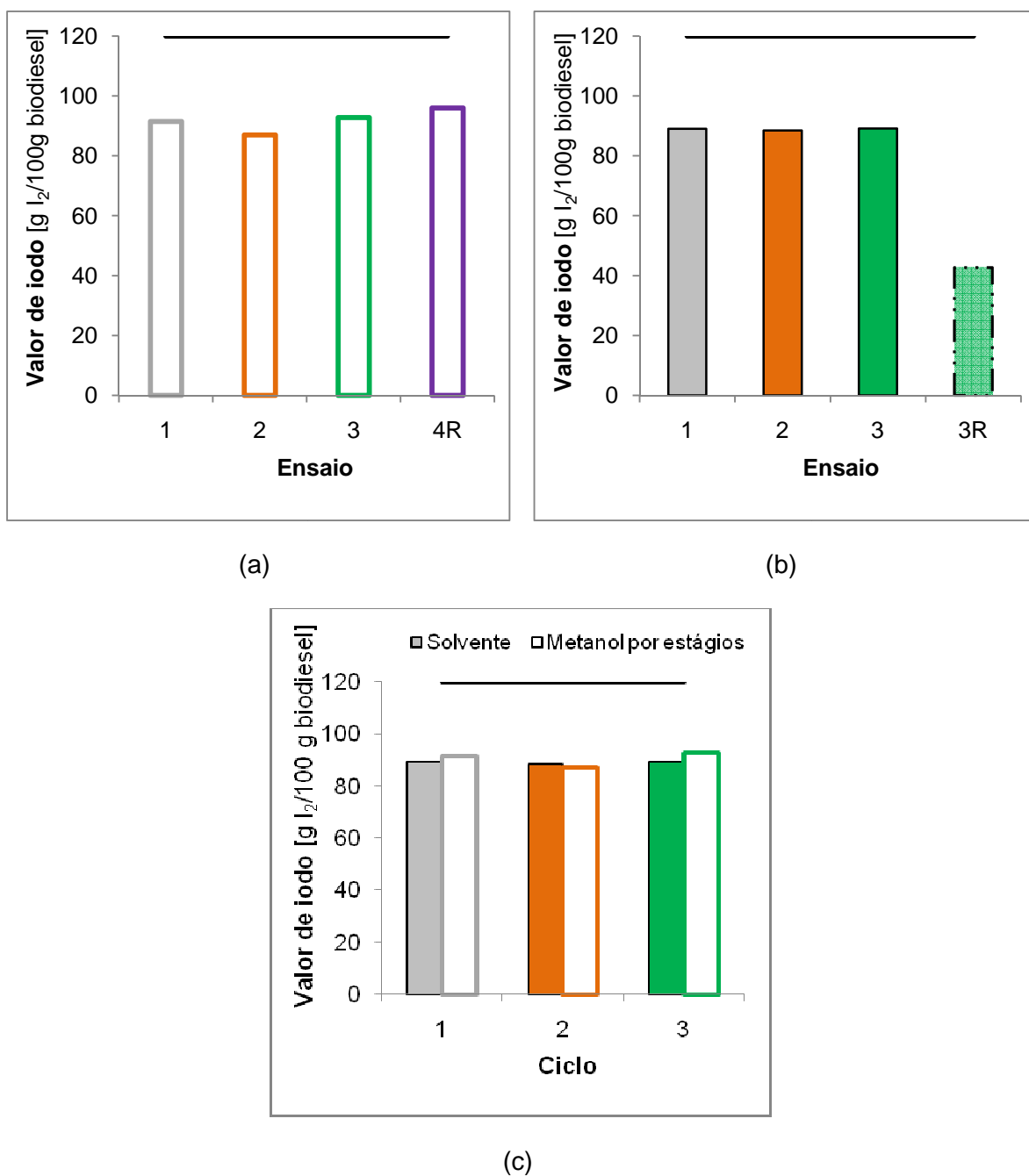
<b>Adição de solvente</b>		<b>Adição de metanol por estágios</b>	
<b>Ciclo</b>	<b>V<sub>titulante gasto</sub> [mL/mL de amostra]</b>	<b>Ciclo</b>	<b>V<sub>titulante gasto</sub> [mL/mL de amostra]</b>
1	5,5	1	3,7
2	4,9	2	2,2
3	3,8	3	1,7
3R	2,9	4R	2,2

Através da análise da tabela anterior, constata-se que nos ensaios com adição de solvente, é quando se regista os maiores volumes de titulante gasto, sendo no caso de adição de metanol por estágios os menores volumes obtidos, com a excepção do Ciclo 1. No método de adição de metanol por estágios, o maior volume de titulante gasto regista-se no Ciclo 1, diminuindo até ao Ciclo 3 e aumentando ligeiramente no Ciclo 4R. Nos ensaios realizados com adição de solvente o volume de titulante gasto diminuiu em todos os ciclos.

Sabe-se que as enzimas catalisam as reacções de transesterificação e esterificação, portanto, esperava-se que fosse consumido um pequeno volume de titulante, o que nem sempre se verificou. Contudo, e como já referido anteriormente, os simples processos de purificação aplicados ao biodiesel foram mais eficientes nos ensaios realizados com adição de metanol por estágios, daí as maiores concentrações de ésteres alcançadas, o que também se reflecte nos menores volumes de titulante gastos.

#### 4.4.5 Valor de iodo

Como já referido, o valor de iodo traduz o nível de saturação da mistura de ésteres metílicos. Neste estudo, este parâmetro foi calculado por CG, de acordo com o procedimento descrito na secção 3.3.1.4. De seguida apresenta-se o valor de iodo referente aos diversos ensaios.



**Figura 4.13** Valor de iodo das amostras de biodiesel, a) metanol por estágios, b) solvente e c) ambos os métodos.

Quando a reacção de transesterificação ocorreu com adição de metanol por estágios (vide Figura 4.13a), constata-se que do Ciclo 1 ao Ciclo 4 existe um ligeiro aumento do valor de iodo, exceptuando-se o Ciclo 2 em que face ao Ciclo 1 este parâmetro decresce ligeiramente. No método de uso de solvente, os três primeiros ciclos apresentam valores de iodo muito semelhantes. Quando, neste método, se realiza regeneração da enzima,

no Ciclo 3, o valor de iodo decresce para menos do dobro, comparando com o mesmo ensaio sem regeneração.

Através da Figura 4.13c) pode-se concluir que no Ciclo 1 e 3 o valor de iodo é sempre superior no método de adição de metanol por estágios, face ao método de adição de solvente, contudo, no Ciclo 2 verifica-se o oposto, sendo no entanto ambos os valores bastante próximos.

Sabe-se que o óleo vegetal virgem que esteve na origem da amostra de OAU utilizada neste trabalho é de amendoim, podendo-se estabelecer uma relação entre os valores obtidos e o valor de iodo deste óleo antes de qualquer processo de fritura (virgem). Brien (1998) e Stauffer (1996) relatam que os valores típicos do valor de iodo do óleo de amendoim variam na gama 84,0 – 100,0 g I<sub>2</sub>/100 g de óleo, valores concordantes com os obtidos no presente estudo. Contudo, os processos de fritura alteram o grau de saturação do óleo, sendo expectável que um óleo virgem possua um valor de iodo inferior ao mesmo óleo após sofrer processos de fritura.

Resumindo, é possível afirmar que todas as amostras de biodiesel analisadas cumprem o limite máximo estabelecido pela norma EN ISO 14214:2003, de 120 g I<sub>2</sub>/100 g de biodiesel (linha representada a preto na Figura 4.13).

## 4.5 Conclusões

A caracterização da matéria-prima é fundamental. Tendo em conta os resultados apresentados na secção 4.2, constata-se que o OAU utilizado neste estudo apresenta características próprias de um óleo que já foi usado, cujas propriedades: viscosidade, densidade, valor ácido, teor de humidade e massa molar, não diferem significativamente dos valores mencionados na bibliografia.

Uma vez que a enzima comercial Novozyme<sup>®</sup> 435 é preparada através da imobilização da lipase *Candida antarctica* num suporte material sólido, a penetração do substrato (OAU) no material pode afectar a taxa de reacção da metanólise, daí ser conveniente realizar o pré-tratamento da enzima. Tendo em conta o trabalho realizado por Amorim (2009), em que as condições operatórias foram as mesmas do presente estudo, com a diferença de que a enzima virgem não sofreu pré-tratamento e após a reacção de transesterificação não foi observada a formação de glicerina; é possível concluir que o pré-tratamento da enzima virgem é extremamente importante, pois altera o estado de agregação da lipase para uma forma aparentemente mais “aberta” afinando a distribuição

da água na lipase. No presente estudo, observou-se a separação de fases em todos os ensaios.

O pré-tratamento de lipases com solventes orgânicos é um dos métodos de modificação das enzimas para melhorar a actividade e estabilidade da lipase na fase não-aquosa, com o objectivo de aumentar a sua actividade hidrolítica e sintética.

Face aos resultados obtidos, conclui-se que quando o solvente usado na reacção de transesterificação é o adequado, obtêm-se maiores rendimentos e velocidades de reacção no método de uso de solvente do que no método de adição de metanol por estágios (para a enzima em estudo), tal é comprovado no Ciclo 1 – uso de solvente. Contudo, estas conclusões apenas se baseiam na cinética e rendimento da reacção, sendo necessário ter em consideração outros factores, como consumos energéticos e necessidade de uma unidade adicional para a recuperação do solvente, por exemplo. Mais ainda, no método de uso de solvente as velocidades iniciais da reacção são superiores face ao método de adição de metanol por estágios. Todavia, neste último a diminuição da velocidade entre ciclos é menos acentuada, apesar disso nunca atinge rendimentos em ésteres tão elevados como no outro método.

Quando a reacção de transesterificação é realizada na ausência de solvente, existe uma maior inactivação da enzima pelo metanol e pela glicerina. Assim, conclui-se que o t-butanol é um bom solvente na reacção de transesterificação do OAU, pois aumenta a síntese de biodiesel. Como o metanol e a glicerina são solúveis no t-butanol, o efeito inibitório do metanol e da glicerina na actividade da lipase é minimizado. Para além de que, o t-butanol não é um substrato para a lipase, pois não actua nos álcoois terciários. Assim, tal como relatado por outros autores (e.g. Sonare & Rathod (2010), Royon *et al.*, 2007), o t-butanol solubiliza o óleo, metanol e glicerina, melhorando as propriedades catalíticas da enzima, originando uma maior conversão de FAME.

Na ausência de solvente a conversão da enzima é inferior, devido à sua inactivação pelo metanol e pela glicerina que fica adsorvida na superfície externa da enzima. Portanto, a conversão alcançada depende fortemente do método utilizado.

Do exposto ao longo do presente estudo, é possível afirmar que no método de adição de solvente, a separação da glicerina e/ou outros contaminantes (reagentes não convertidos, solvente) é mais fácil do que no método em que o metanol foi adicionado por estágios, o que não está de acordo com as concentrações de ésteres, pois estas foram superiores no método de adição de metanol por estágios.

O método adoptado na purificação do biodiesel não permitiu separar os triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos não convertidos, uma vez que a concentração de ésteres máxima, em nenhum dos métodos foi alcançada.

Por fim, para clarificar o processo de tomada de decisão, seria recomendável fazer uma análise económica aos dois ensaios referidos anteriormente.

Pelo exposto anteriormente, em termos de rendimento em ésteres, facilmente se conclui que o biodiesel não cumpre os requisitos de qualidade mínima impostos pela norma EN ISO 14214:2003.



## **5 Considerações finais**

### **5.1 Introdução**

O sucesso do processo de produção de biodiesel está largamente dependente de diferentes variáveis, principalmente, a natureza da matéria-prima e do catalisador, assim como das condições operatórias.

No presente estudo, o óleo alimentar usado foi a matéria-prima seleccionada e a reacção de transesterificação teve lugar na presença de um catalisador enzimático sob dois métodos de operação distintos.

Na secção 0 são tecidas as principais conclusões deste trabalho, sendo na última secção apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros.

### **5.2 Conclusões gerais**

Com a realização deste estudo, cujo objectivo consistiu na avaliação da perda de actividade da Novozyme<sup>®</sup> 435 recorrendo-se a dois métodos, constatou-se que o rendimento da reacção, assim como a qualidade do produto final resultante, dependem fortemente do método adoptado – uso de solvente ou adição de metanol por estágios.

A realização do pré-tratamento na enzima virgem demonstrou-se ser muito importante na separação dos dois produtos da reacção, bem como no maior rendimento em ésteres alcançado. Comparando os resultados obtidos com o trabalho de Amorim (2009), onde as condições experimentais foram as mesmas do presente estudo e a enzima virgem não foi pré-tratada não sendo possível visualizar qualquer separação de fases, confirma-se o

referido anteriormente. O exposto é relatado por outros autores, como por exemplo, Sonare and Rathod (2010). Ainda não é claro a forma como o pré-tratamento funciona, mas provavelmente aumenta a transferência de massa na camada superficial da enzima ou altera a fase das intra-partículas, bem como resguarda a proximidade da enzima através da inibição do álcool e glicerol.

Este trabalho permitiu concluir que, de entre os dois métodos estudados, o método com recurso a uso de solvente permitiu maior facilidade na separação de fases (biodiesel e glicerol), apesar de posteriormente não se ter verificado no teor de ésteres do biodiesel. Este teor apresentou valores mais elevados no método de adição de metanol por estágios, o que significa que os simples processos de purificação utilizados neste estudo surtiram maior efeito no método de adição de metanol por estágios. Apesar dos maiores rendimentos em ésteres serem alcançados no método de uso de solvente, como já mencionado, em relação ao teor de ésteres do bioiesel purificado, acontece o oposto. O que leva a concluir que os contaminantes presentes no biodiesel, maioritariamente dizem respeito a glicerol.

É possível afirmar que em relação à perda de actividade da enzima, traduzida na diminuição do rendimento em ésteres, esta é mais acentuada nos ensaios com uso de solvente, e em ambos os métodos. Ao final do terceiro ciclo consecutivo, o rendimento em ésteres atingido é muito semelhante em ambos os métodos. É importante referir que as conversões máximas atingidas no método de uso de solvente, nunca são alcançadas no método de uso de metanol por estágios.

O exposto anteriormente, também se traduz ao nível da velocidade inicial da reacção, onde as maiores velocidades são alcançadas no método de uso de solvente, sendo sensivelmente o dobro das alcançadas no método de adição de metanol por estágios.

Em relação ao efeito da regeneração da enzima no método de uso de solvente, constatou-se que este procedimento aumentou ligeiramente o rendimento em ésteres, contudo era expectável que esse aumento fosse mais notório. A velocidade inicial da reacção é sensivelmente superior quando é realizada a regeneração da enzima. É conveniente testar outros solventes e limpeza, para averiguar qual o mais indicado para a Novozyme® 435 nestas condições operatórias, com o intuito de aumentar o rendimento em ésteres.

O método de uso de solvente, por vezes é apontado na literatura como inconveniente, devido à necessidade de uma unidade de extracção adicional. Todavia, esta prática é



---

muito comum após a produção de biodiesel via catálise homogénea para extrair o metanol usado em excesso.

Ambos os métodos estudados apresentam vantagens e desvantagens. É de destacar a particularidade de que no método de uso de solvente o estado de equilíbrio é atingido mais rapidamente do que no método de uso de solvente, o que se vai repercutir numa diferença do consumo energético entre ambos os métodos.

As duas grandes limitações na síntese de biodiesel através de catálise enzimática dizem respeito ao custo elevado das enzimas, que pode ser atenuado através da imobilização (que permite a sua reutilização) e outra é a sua inactivação pelo metanol.

Do apresentado ao longo deste trabalho, é possível afirmar que o rendimento em ésteres alcançado no Ciclo 1 do método de uso de solvente é semelhante ao alcançado na catálise homogénea. Portanto, este método, em termos do rendimento da reacção, torna-se competitivo face à catálise homogénea, usada industrialmente na produção de biodiesel. Contudo, apresenta algumas limitações como: (i) maior tempo de reacção (em relação aos catalisadores homogéneos), (ii) custo do catalisador. No entanto, estes catalisadores quando usados na forma imobilizada, podem recuperados e reutilizados; o que não é possível com os catalisadores homogéneos. O uso de catalisadores enzimáticos na reacção de transesterificação, origina produtos (biodiesel e glicerol) muito mais puros que na catálise homogénea, sendo prescindível a etapa de lavagem de biodiesel, evitando a produção de um resíduo de gestão adequada.

Posto isto, para uma conclusão inequívoca acerca do método estudado mais compatível com a catálise homogénea, seria necessário uma análise económica.

No que concerne à caracterização do produto final obtido, verificou-se que este não cumpria grande parte dos limites impostos pela EN ISO 14214:2003, portanto a sua utilização como combustível poderá acarretar problemas para o motor do veículo e do ambiente. Contudo, relembra-se o facto de que o biodiesel sofreu processos de purificação muito simples, não tendo sido explorados diferentes processos de purificação.

A possibilidade de produzir biodiesel a partir de óleos alimentares usados constitui uma boa alternativa para este resíduo. No entanto, é fundamental continuar a investigação neste campo de tecnologia, em especial os catalisadores enzimáticos pois o seu estudo é muito mais recente que os catalisadores homogéneos.

### 5.3 Sugestões para trabalhos futuros

Após conclusão do presente trabalho e tendo em conta os resultados obtidos e conhecimentos adquiridos, verifica-se ser necessário a clarificação/exploração de alguns aspectos, dois quais se realçam:

- efectuar um estudo semelhante com diferentes valores ácidos do OAU;
- investigar outros métodos de pré-tratamento da enzima;
- estudar impactes ambientais decorrentes da produção deste combustível renovável, desde: o uso do solo, qualidade do ar, consumo e rejeição das águas, consumo de energia para o processo, entre outros aspectos;
- numa óptica de aplicação industrial, estudar o procedimento em leito fixo, de forma a eliminar a necessidade de filtração da enzima da mistura final, ou seja, usar um reactor contínuo em detrimento de m batch;
- estudo de um processo aplicável à produção de biodiesel, onde os produtos formados são extraídos do meio reaccional à medida que são produzidos, aumentando-se desta forma a extensão da reacção reversível que é a transesterificação;
- investigação de condições operatórias que visem a redução do tempo reaccional, com vista a tornar a catálise enzimática atractiva a nível industrial;
- estudo de um processo de reacção usando duas lipases imobilizadas com complementaridade na posição específica (por exemplo, uma enzima da família Novozyme® e outra da família Lipozyme®) em detrimento de uma só lipase, uma vez que esta via pode reduzir o custo da produção de biodiesel.

Caso fosse possível a reprodução do presente trabalho, e uma vez que a regeneração da enzima apresentou efeitos pouco satisfatórios, era interessante estudar o uso de outros solventes e averiguar o seu comportamento ao nível do rendimento em ésteres.

Seria também interessante otimizar as condições operatórias da enzima Novozyme® 435, deste modo esta teria de ser sujeita a um estudo mais alargado no que diz respeito à razão mássica de catalisador, razão volumétrica de solvente, temperatura de reacção e velocidade de agitação, com vista a alcançar condições operatórias competitivas com a catálise homogénea alcalina.

Conclui-se que a temática do biodiesel possui ainda uma vasta informação a ser explorada.



---

## Referências

### I. Referências bibliográficas

Aehle, W. (2004). Enzymes in industry : production and applications.

Al-Zuhair, S. (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, 1(1), 57-66.

Al-Zuhair, S., Ling, F. W. and Jun, L. S. (2007). Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. [doi: DOI: 10.1016/j.procbio.2007.03.002]. *Process Biochemistry*, 42(6), 951-960.

Al-Zuhair, S., Ramachandran, K. B. and Hasan, M. (2008). Effect of enzyme molecules covering of oil-water interfacial area on the kinetic of oil hydrolysis. [doi: DOI: 10.1016/j.cej.2007.08.030]. *Chemical Engineering Journal*, 139(3), 540-548.

Amorim, A. L. S. (2009). Biodiesel a partir de óleo alimentar usado: estudo de catalisadores. Universidade de Aveiro, Aveiro.

Antczak, M. S., Kubiak, A., Antczak, T. and Bielecki, S. (2009). Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. [doi: DOI: 10.1016/j.renene.2008.11.013]. *Renewable Energy*, 34(5), 1185-1194.

Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, H. J. and Navia, R. (2010). Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(3), 621-636.

Barnwal, B. K. and Sharma, M. P. (2005). Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. [doi: DOI: 10.1016/j.rser.2004.05.007]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9(4), 363-378.

Bautista, L. F., Vicente, G., Rodríguez, R. and Pacheco, M. (2009). Optimisation of FAME production from waste cooking oil for biodiesel use. [doi: DOI: 10.1016/j.biombioe.2009.01.009]. *Biomass and Bioenergy*, 33(5), 862-872.

Brien, R. D. O. (1998). *Fats and Oils - Formulating and processing for applications*.

Caballero, V., Bautista, F. M., Campelo, J. M., Luna, D., Marinas, J. M., Romero, A. A. et al. (2009). Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic

lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochemistry*, 44(3), 334-342.

Caetano, N. S. and Fernandes, D. S. N. S. (2007). Catalisadores alternativos na produção de biodiesel a partir de óleo alimentar usado.

Carrin, M. E. and Carelli, A. A. (2010). Peanut oil: Compositional data. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(7), 697-707.

Castro, H. F., Mendes, A. A., Santos, J. C. and Aguiar, C. L. (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quimica Nova*, 27(1), 146-156.

Chapman and Hall. (1992). *Riegel's handbook of industrial chemistry*.

Chen, G. Y., Ying, M. and Li, W. Z. (2006). Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel-biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 132(1-3), 911-921.

Chen, J.-W. and Wu, W.-T. (2003). Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. [doi: DOI: 10.1016/S1389-1723(03)80046-4]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(5), 466-469.

Deng, L., Tan, T., Wang, F. and Xu, X. (2003). Enzymatic production of fatty acid alkyl esters with a lipase preparation from *Candida* sp. 99-125. *Lipid-Fett*, 105(12), 727-734.

Dias, J. M., Alvim-Ferraz, M. C. M. and Almeida, M. F. (2008). Mixtures of Vegetable Oils and Animal Fat for Biodiesel Production: Influence on Product Composition and Quality. [Article]. *Energy & Fuels*, 22(6), 3889-3893.

Du, W., Xu, Y. and Liu, D. (2003). Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. *Biotechnol Appl Biochem*(38), 103-106.

E. Stauffer, C. (1996). *Fats & Oils - Practical guides for the food industry*

Encinar, J. M., Gonzalez, J. F. and Rodriguez-Reinares, A. (2005). Biodiesel from used frying oil. Variables affecting the yields and characteristics of the biodiesel. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(15), 5491-5499.

*Enzymes in industry : production and applications*. (2004). (2nd completely revised edition ed.): Weinheim : Wiley-VCH.

*Enzymology Labfax*. (1996). Guildford: Academic Press

Felizardo, P. (2003). *Produção de Biodiesel a Partir de Óleos Usados de Fritura*.

- 
- Felizardo, P., Neiva Correia, M. J., Raposo, I., Mendes, J. F., Berkemeier, R. and Bordado, J. M. (2006). Production of biodiesel from waste frying oils. [doi: DOI: 10.1016/j.wasman.2005.02.025]. *Waste Management*, 26(5), 487-494.
- Ferrari, R. A., Oliveira, V. d. S. and Scabio, A. (2005). Biodiesel de soja : taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, 28, 19-23.
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V. and Norddahl, B. (2009). A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1298-1315.
- Fu, B. Y. and Vasudevan, P. T. (2009). Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. [Article]. *Energy & Fuels*, 23(8), 4105-4111.
- Gao, Y., Tan, T.-W., Nie, K.-L. and Wang, F. (2006). Immobilization of Lipase on Macroporous Resin and Its Application in Synthesis of Biodiesel in Low Aqueous Media. [doi: DOI: 10.1016/S1872-2075(06)60008-3]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(1), 114-118.
- Gonçalves, E. D. L. and Ferreira, L. L. (2008). Flexibilidade na utilização de Diesel ou Biodiesel: uma abordagem via Opções Reais. (Portuguese). [Article]. *Brazilian Business Review (Portuguese Edition)*, 5(3), 229-243.
- Haas, M. J., 1997. Patent No: 5697986.
- Halim, S. F. A. and Harun Kamaruddin, A. (2008). Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. [doi: DOI: 10.1016/j.procbio.2008.08.010]. *Process Biochemistry*, 43(12), 1436-1439.
- Halim, S. F. A. and Kamaruddin, A. H. (2008). Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. *Process Biochemistry*, 43(12), 1436-1439.
- Helwani, Z., Othman, M. R., Aziz, N., Kim, J. and Fernando, W. J. N. (2009). Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: A review. *Applied Catalysis a-General*, 363(1-2), 1-10.
- Hernandez-Martin, E. and Otero, C. (2008). Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM. [Article]. *Bioresource Technology*, 99(2), 277-286.
-

- Kaya, C., Hamamci, C., Baysal, A., Akba, O., Erdogan, S. and Saydut, A. (2009). Methyl ester of peanut (*Arachis hypogea* L.) seed oil as a potential feedstock for biodiesel production. [doi: DOI: 10.1016/j.renene.2008.10.002]. *Renewable Energy*, 34(5), 1257-1260.
- Knez, E. (2009). Enzymatic reactions in dense gases. [Review]. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 357-372.
- Lai, C. C., Zullaikah, S., Vali, S. R. and Ju, Y. H. (2005). Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(3), 331-337.
- Lam, M. K., Lee, K. T. and Mohamed, A. R. (2010). Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. [doi: DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.03.002]. *Biotechnology Advances*, 28(4), 500-518.
- Leung, D. Y. C., Wu, X. and Leung, M. K. H. (2009). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. [doi: DOI: 10.1016/j.apenergy.2009.10.006]. *Applied Energy*, In Press, Corrected Proof.
- Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L. and Li, Z. (2006). Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. [doi: DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.06.012]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 58-62.
- Lu, J., Deng, L., Zhao, R., Zhang, R., Wang, F. and Tan, T. (2010). Pretreatment of immobilized *Candida* sp. 99-125 lipase to improve its methanol tolerance for biodiesel production. [doi: DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.08.002]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 15-18.
- Maceiras, R., Vega, M., Costa, C., Ramos, P. and Marquez, M. C. (2009). Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. [Article]. *Fuel*, 88(11), 2130-2134.
- Mathewson, P. R. (1998). *Enzymes*.
- Maurício, S. S. S. (2008). A produção de biodiesel a partir de óleos alimentares usados. Universidade de Aveiro, Aveiro.



- 
- Meng, X. M., Chen, G. Y. and Wang, Y. H. (2008). Biodiesel production from waste cooking oil via alkali catalyst and its engine test. *Fuel Processing Technology*, 89(9), 851-857.
- Modi, M. K., Reddy, J. R. C., Rao, B. V. S. K. and Prasad, R. B. N. (2007). Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. [doi: DOI: 10.1016/j.biortech.2006.05.006]. *Bioresource Technology*, 98(6), 1260-1264.
- Neto, P. R. C. (2002). Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. Universidade de Santa Catarina, Florianópolis.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F. and Tan, T. (2006). Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. [doi: DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.07.016]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 142-147.
- Ognjanovic, N., Bezbradica, D. and Knezevic-Jugovic, Z. (2009). Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technology*, 100(21), 5146-5154.
- Oliveira, S. (2009). Análise de GHB e Substâncias Precursoras em Bebidas Alcoólicas.
- Pérez, Á., Casas, A., Fernández, C. M., Ramos, M. J. and Rodríguez, L. (2010). Winterization of peanut biodiesel to improve the cold flow properties. [doi: DOI: 10.1016/j.biortech.2010.04.063]. *Bioresource Technology*, 101(19), 7375-7381.
- Predojevic, Z. J. (2008). The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps. *Fuel*, 87(17-18), 3522-3528.
- Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L. and Muthukumar, K. (2008). An overview of enzymatic production of biodiesel. [Review]. *Bioresource Technology*, 99(10), 3975-3981.
- Refaat, A. A. (2010). Different techniques for the production of biodiesel from waste vegetable oil. [Review]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7(1), 183-213.
- Rodrigues, R. C., Volpato, G., Wada, K. and Ayub, M. A. Z. (2008). Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(10), 925-930.
- Rodrigues, S. (2006). Óleos alimentares usados - ponto de situação deste fluxo de resíduo a nível nacional. Universidade Nova de Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia.
-

- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G. and Locatelli, S. (2007). Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. [doi: DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.021]. *Bioresource Technology*, 98(3), 648-653.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M. and Solinas, V. (2008). Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. [doi: DOI: 10.1016/j.molcatb.2007.12.006]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 54(1-2), 19-26.
- Shah, S. and Gupta, M. N. (2007). Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. [doi: DOI: 10.1016/j.procbio.2006.09.024]. *Process Biochemistry*, 42(3), 409-414.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. et al. (1999). Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76(7), 789-793.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. and Tominaga, Y. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. [doi: DOI: 10.1016/S1381-1177(02)00020-6]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3-5), 133-142.
- Sonare, N. R. and Rathod, V. K. (2010). Transesterification of used sunflower oil using immobilized enzyme. [Article]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 66(1-2), 142-147.
- Talukder, M. M. R., Wu, J. C., Van Nguyen, T. B., Fen, N. M. and Melissa, Y. L. S. (2009). Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. [doi: DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.04.004]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60(3-4), 106-112.
- Uhlir, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. New York: John Wiley.
- Vieira, A., Simões, B. and Caetano, N. S. (2009). Produção de biodiesel por catálise enzimática e etanol.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. and Tominaga, Y. (2000). Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(4), 355-360.

## **II. Sites na internet**

- [1] BP Portugal S.A., O que é o cetano e porque é tão importante, 2010. Disponível em <http://www.bp.com/sectiongenericarticle.do?categoryId=4505263&contentId=7010980> URL: <http://www.bp.com/sectiongenericarticle.do?categoryId=4505263&contentId=7010980> e acedido em Agosto de 2010.

## **III. Legislação**

Decreto-Lei n.º 178/2006, de 5 de Setembro

Decreto-Lei n.º 267/2009, de 29 de Setembro

Decreto-Lei n.º 62/2006, de 21 de Março

EN ISO 14214:2003(E)

(EN 14103:2003),

ISO 3675:1998(E)

ISO 3675:1998(E)

ISO 12937:2003.

NP ISO 3104:1999

Portaria n.º 209/2004, de 3 de Março



---

## Anexo A – Dados de segurança de reagentes e catalisador

**Tabela A.1** *Dados de segurança da acetona (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>Acetona</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Facilmente inflamável. Irritante para os olhos e pele. Exposições repetidas ou prolongadas podem provocar irritação cutânea e dermatite, devido às propriedades desengordurantes do produto.
<b>Manuseamento:</b>	Manter o recipiente bem fechado. Tomar as precauções necessárias para evitar descargas de electricidade estática. Usar apenas em áreas providas de ventilação apropriada. Não respirar vapores ou spray. Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuários. Não deitar os resíduos no esgoto.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Luvas e óculos de protecção, equipamento respiratório adequado (quando a ventilação for insuficiente) e avental quimicamente resistente.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	Extinguir preferencialmente com produto químico seco, espuma, camada de dióxido de carbono.

**Tabela A.2** *Dados de segurança do álcool isopropílico (José M. Vaz Pereira, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>Álcool isopropílico</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Facilmente inflamável. Irritante para os olhos. Pode provocar sonolência e vertigens, por inalação de vapores.
<b>Manuseamento:</b>	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição. Tomar medidas para impedir a formação de electricidade estática. Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Óculos e máscara de segurança, luvas de protecção e bata.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	Espuma resistente a álcool ou água em spray para pequenos focos. Extintor de CO, pó químico seco, areia ou terra. Não usar jacto de água directo.

**Tabela A.3** *Dados de segurança da clorotrimetilsilano (Merck, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>Clorotrimetilsilano</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Facilmente inflamável. Reage violentamente em contacto com a água. Provoca queimaduras graves. Irritante para as vias respiratórias.
<b>Manuseamento:</b>	Evitar o contacto com a substância. Não inalar os vapores/aerossóis. Garantir a ventilação com ar fresco em recintos fechados. Tomar medidas contra cargas electrostáticas. Conservar hermeticamente fechado, em local bem ventilado e afastado de fontes de ignição e de calor.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Necessária protecção respiratória, no caso de formação de vapores/aerossóis. Luvas de protecção, óculos de segurança e bata.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	CO <sub>2</sub> , pó.

**Tabela A.4** *Dados de segurança do éter de petróleo (Merck, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>Éter de petróleo</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Facilmente inflamável. Nocivo: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação.
<b>Manuseamento:</b>	Tomar medidas contra cargas electrostáticas. trabalhar com chaminé. Não inalar a substância. Evitar a formação de vapores/aerossóis. Manter afastado de fontes de ignição. Conservar hermeticamente fechado, em local bem ventilado.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Luvas de protecção, óculos de segurança e protecção respiratória.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	Espuma, pó, CO <sub>2</sub> .

**Tabela A.5** *Dados de segurança do metanol (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>Metanol</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Facilmente inflamável. Tóxico por inalação e ingestão. Exposições repetidas ou prolongadas podem provocar irritação cutânea e dermatite, devido às propriedades desengordurantes do produto.
<b>Manuseamento:</b>	Utilizar apenas em áreas bem arejadas. Não respirar vapores ou sprays. Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuário. Tomar as precauções necessárias para evitar descargas de electricidade estática. Manter hermeticamente fechado, em local seco, fresco e bem arejado.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Óculos de segurança, bata, luvas de protecção e máscara no caso de formação de aerossóis.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	CO <sub>2</sub> , produto químico seco, espuma, waterspray.

**Tabela A.6** *Dados de segurança do metil heptadecanoato (Fluka, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>Metil heptadecanoato</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Esta substância não é classificada como perigosa de acordo com a Directiva 67/548/CEE.
<b>Manuseamento:</b>	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Não é necessária protecção respiratória. Para um contacto prologado ou repetitivo pôr luvas de protecção. Óculos de segurança.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	Extinguir preferencialmente com produto químico seco, espuma, camada de dióxido de carbono.



**Tabela A.7** *Dados de segurança da N,O-Bis (trimetilsilil)Trifluoracetamida (Panreac, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>N,O-Bis (trimetilsilil)Trifluoracetamida</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Inflamável.
<b>Manuseamento:</b>	Evitar a formação de cargas electrostáticas. Armazenar em recipientes bem fechados, em local fresco e afastado de substâncias inflamáveis, fontes de ignição e calor, à temperatura ambiente.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Em caso de formação de vapores/aerossóis usar equipamento respiratório adequado, luvas de protecção, óculos de segurança e bata.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	CO <sub>2</sub> , espuma, pó seco.

**Tabela A.8** *Dados de segurança da piridina (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>Piridina</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Facilmente inflamável. Nocivo por inalação, contacto com a pele e por ingestão. Os vapores são inflamáveis, irritante para os olhos e sistema respiratório.
<b>Manuseamento:</b>	Usar apenas em áreas providas de ventilação apropriada. Não respirar vapores ou spray. Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuário. Guardar longe de chamas, superfícies aquecidas e fontes de ignição. Tomar medidas de precaução contra descargas estáticas.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Luvas resistentes a solventes, óculos de protecção, bata e protecção respiratória, no caso de ventilação insuficiente.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	Produto químico seco, espuma, areia e CO <sub>2</sub> .

**Tabela A.9** *Dados de segurança do tert-butanol (Sigma-Aldrich, ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>tert-butanol</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Facilmente inflamável. Nocivo por inalação.
<b>Manuseamento:</b>	Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição. Tomar medidas para impedir a formação de electricidade estática. Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Luvas de protecção, óculos de segurança e protecção respiratória.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	Espuma de álcool, pó seco, CO <sub>2</sub> .

**Tabela A.10** *Dados de segurança da Novozyme® 435 (Novozymes France S.A., ficha de dados de segurança do produto).*

<b>Nome do produto:</b>	<b>Novozyme® 435</b>
<b>Identificação dos perigos:</b>	Nocivo. Pode causar sensibilidade por inalação. Ligeiramente irritante para a pele e olhos.
<b>Manuseamento:</b>	Assegurar ventilação adequada. Evitar a formação de poeiras.
<b>Medidas de protecção individuais:</b>	Óculos de segurança com anteparos laterais, luvas de protecção e roupa com mangas compridas. No caso de ventilação insuficiente, usar equipamento respiratório adequado.
<b>Medidas de combate a incêndios:</b>	Água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou CO <sub>2</sub> .

---

## Anexo B – Destino dos resíduos produzidos neste estudo

Na tabela que se segue sumaria-se os resíduos produzidos no presente trabalho, assim como o respectivo destino.

***Tabela B.11*** *Resíduos gerados neste estudo e respectivo destino.*

Resíduo	Destino
Glicerina	Armazenamento em recipiente com vista a posterior valorização.
Enzima	Armazenamento para posterior reutilização.
Resíduos indiferenciados	Encaminhamento para tratamento juntamente com os restantes resíduos produzidos pelo Departamento de Ambiente e Ordenamento.
Solventes/metanol recuperados	Armazenamento e reutilização em trabalhos posteriores.



## Anexo C – Grelha de resultados

**Tabela C.12** Resultados pormenorizados nos diversos ensaios realizados.

	Ensaio	m <sub>OA</sub> [g]	m <sub>catalisador</sub> [g]	V <sub>metanol</sub> [mL]	V <sub>metanol</sub> por estágios [mL]	Frequência de adição	Solvente	V <sub>solvente</sub> [mL]	Agitação orbital [rpm]	V <sub>solvente</sub> recuperado [mL]	V <sub>metanol</sub> recuperado [mL]	V <sub>amostra</sub> antes da secagem [mL]	V <sub>amostra</sub> após secagem [mL]
Adição de metanol por estágios	1	150	15	27,2	6,8	0, 12, 24, 36	–	–	200	–	23	–	–
	2	150	15	27,2	6,8	0, 12, 24, 36	–	–	200	–	3,65	174	165
	3	150	15	27,2	6,8	0, 12, 24, 36	–	–	200	–	–	–	–
	4	150	15	27,2	6,8	0, 12, 24, 36	–	–	200	–	12	152	144
Adição de solvente	1	150	15	27,2	27,2	–	tert-butanol	120	200	115	–	–	–
	2	150	15	27,2	27,2	–	tert-butanol	120	200	113	–	182	164
	3	75	7,5	13,6	27,2	–	tert-butanol	60	200	46	–	83	72
	3 R	75	7,5	13,6	27,2	–	tert-butanol	60	200	57	–	78	68

